

“Efecto de ácido abscísico y giberelina A₃ sobre la anatomía de tejidos vasculares y la expresión génica de transportadores de azúcares en plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec”

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Germán Murcia

Ingeniero Agrónomo-Universidad Nacional de Cuyo-2010

Instituto de Biología Agrícola de Mendoza-UNCuyo-CONICET



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Patricia Piccoli

Microbióloga (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Co-director

Rubén Bottini

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Consejero de Estudios

Rodolfo Sánchez

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Fisiología Vegetal (Universidad de California)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Patricia Piccoli

Microbióloga (Universidad Nacional de Río Cuarto)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Río Cuarto)

JURADO

Andrea Vega

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Estela Valle

Bioquímica (Universidad Nacional de Rosario)

Doctora en Bioquímica (Universidad Nacional de Rosario)

JURADO

Lorenzo Lamattina

Ingeniero Rural (Universidad Nacional de Lomas de Zamora)

Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Fecha de defensa de la tesis: 22 de MARZO de 2016

DEDICATORIAS

A mi familia por apoyarme siempre en todo lo que emprendo en la vida, especialmente a mis padres (Griselda y Mario) que me dieron la oportunidad de estudiar, me incentivaron a ser mejor día a día y me enseñaron a nunca bajar los brazos.

A mis hermanos, amigos de toda la vida (Adolfo, Iván, Ramiro, Agustín, Jonathan, Juan), por estar siempre, apoyarme y aconsejarme.

A mi novia Florencia por ser la compañera perfecta durante estos arduos cinco años de trabajo, por darme contención, cariño, consejos y por sobre todas las cosas por sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Patricia Piccoli y Rubén Bottini por aceptarme para realizar la tesis, por su guía, apoyo y conocimientos para poder culminar esta etapa de mi vida.

A mi amiga y tutora Dra. Mariela Pontin, por enseñarme de la mejor manera posible todo lo que estuvo a su alcance y formar parte de mi formación, por su particular sentido del humor y acompañarme siempre en las buenas y en las no tan buenas.

A los Dres. Sebastián Gómez-Talquenca y Herminda Reinoso por brindarme sus conocimientos y ser parte de mi formación.

A mis compañeros de laboratorio (Viqui, Iván, Dani, Fede, Rodri, Leo, Andrea, Ariel) que me brindaron su amistad y experiencia.

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

2015. Murcia, G; Pontin, M; Reinoso, H; Baraldi, R; Bertazza, G; Gómez-Talquenca, S; Bottini, R; Piccoli, P. ABA and GA₃ increase carbon allocation in different organs of grapevine plants by inducing accumulation of non-structural carbohydrates in leaves, enhancement of phloem area and expression of sugar transporters. *Physiologia Plantarum*. DOI: 10.1111/ppl.12390. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26411544>

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1: Antecedentes, objetivos e hipótesis.....	1
Antecedentes.....	2
1.1 Hormonas vegetales.....	2
1.1.1 Ácido abscísico.....	2
1.1.1.1 Características estructurales.....	2
1.1.1.2 Efectos fisiológicos del ABA.....	3
1.1.1.3 Metabolismo del ABA.....	4
1.1.1.3.1 Biosíntesis del ABA.....	4
1.1.1.3.2 Catabolismo del ABA.....	5
1.1.1.3.3 Conjugación del ABA.....	6
1.1.1.4 Transporte del ABA.....	6
1.1.1.5 Señalización del ABA.....	7
1.1.2 Giberelinas.....	10
1.1.2.1 Estructura de las GAs.....	11
1.1.2.2 Efectos fisiológicos de las GAs.....	11
1.1.2.3 Metabolismo de las GAs.....	12
1.1.2.3.1 Biosíntesis de las GAs.....	12
1.1.2.3.2 Catabolismo y conjugación de las GAs.....	14
1.1.2.4 Señalización de GAs.....	15
1.2 La vid.....	17
1.2.1 El Malbec.....	18
1.2.2 El cultivo de la vid en Argentina.....	19
1.2.3 Metabolismo de la vid.....	19
1.2.3.1 Desarrollo de la baya.....	19
1.2.3.2 Metabolismo y transporte de fotoasimilados.....	20
1.2.3.3 ABA y la partición de fotoasimilados.....	21
1.2.3.4 GAs y la partición de fotoasimilados.....	22
Objetivos e hipótesis.....	23
1.3 Objetivo general.....	23
1.3.1 Objetivos específicos.....	23
1.4 Hipótesis de trabajo.....	23
Capítulo 2: Efecto regulador de ABA y GA ₃ sobre parámetros de crecimiento, parámetros fisiológicos y la partición de fotoasimilados en plantas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv. Malbec. ...	24
2.1 Introducción.....	25

2.2 Materiales y Métodos.....	27
2.2.1 Material vegetal y condiciones experimentales	27
2.2.2 Parámetros de crecimiento	28
2.2.2.1 Largo del brote, largo de entrenudos y número de nudos por planta	28
2.2.2.2 Área foliar total	28
2.2.2.3 Peso específico de las hojas	29
2.2.3 Parámetros fisiológicos	29
2.2.3.1 Fotosíntesis neta y conductancia estomática	29
2.2.3.2 Pigmentos fotosintéticos	29
2.2.4 Análisis anatómicos	29
2.2.4.1 Improntas	29
2.2.5 Partición de fotoasimilados	30
2.2.6 Análisis de datos	30
2.3 Resultados	31
2.3.1 Efecto de ABA y GA ₃ sobre la fenología y los parámetros de crecimiento.....	31
2.3.2 Efecto de ABA y GA ₃ sobre los parámetros fisiológicos y la densidad estomática	31
2.3.3 Efecto de ABA y GA ₃ sobre la partición de fotoasimilados	33
2.4 Discusión.....	35
Capítulo 3: Efecto regulador de ABA y GA ₃ sobre la anatomía vascular, la conductividad hidráulica del tallo y el perfil de carbohidratos no estructurales y ácidos orgánicos en plantas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv. Malbec.....	37
3.1 Introducción	38
3.2 Materiales y Métodos.....	41
3.2.1 Material vegetal y condiciones experimentales	41
3.2.2 Análisis anatómicos	41
3.2.3 Contenido de azúcares solubles y ácidos orgánicos.....	41
3.2.4 Determinación de almidón	42
3.2.5 Determinación de la actividad amilasa.....	43
3.2.6 Ensayos de conductividad hidráulica	45
3.2.7 Determinación del potencial agua pre-amanecer	46
3.2.8 Análisis de datos	46
3.3 Resultados	47
3.3.1 ABA y GA ₃ modifican el área de los tejidos vasculares.....	47
3.3.2 ABA y GA ₃ modifican las concentraciones de carbohidratos no estructurales y ácidos orgánicos en hojas y bayas.....	48
3.3.3 GA ₃ modifica la conductividad hidráulica máxima de los tallos (k _{max})	53

3.3.4 ABA y GA ₃ afectan el potencial agua de pre-amanecer.....	53
3.4 Discusión.....	55
Capítulo 4: Efecto regulador del ABA y GA ₃ sobre la expresión de genes que codifican para transportadores de azúcares en hojas y bayas de plantas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv. Malbec...	58
4.1 Introducción	59
4.2 Materiales y Métodos.....	62
4.2.1 Material vegetal y condiciones experimentales	62
4.2.2 Extracción de ARN	62
4.2.3 Purificación y retrotranscripción.....	62
4.2.4 Experimentos de PCR en tiempo real	63
4.2.5 Análisis de datos	65
4.3 Resultados	66
4.3.1 ABA y GA ₃ modifican la expresión de los genes transportadores de azúcares en hojas y bayas	66
4.4 Discusión.....	72
Capítulo 5: Efecto regulador de ABA y GA ₃ sobre el perfil de metabolitos secundarios en hojas, bayas y raíces de plantas de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.) cv. Malbec.....	75
5.1 Introducción	76
5.2 Materiales y Métodos.....	79
5.2.1 Material vegetal y condiciones experimentales	79
5.2.2 Extracción y cuantificación de aminoácidos libres	79
5.2.3 Extracción y cuantificación de antocianos y polifenoles de bajo peso molecular (PBPM)	80
5.2.3.1 Purificación de antocianinas y PBPM.....	80
5.2.3.2 Análisis mediante HPLC-MWD	81
5.2.4 Extracción y cuantificación de mono-, sesqui- y triterpenos	81
5.2.5 Análisis de datos	82
5.3 Resultados	83
5.3.1 Las aplicaciones con ABA y GA ₃ modifican los contenidos de aminoácidos libres en hojas de plantas de vid	83
5.3.2 Las aplicaciones con ABA y GA ₃ modifican los contenidos de aminoácidos libres en bayas de plantas de vid.....	84
5.3.3 Las aplicaciones con ABA y GA ₃ modifican los contenidos de aminoácidos libres en raíces de plantas de vid	86
5.3.4 Las aplicaciones con ABA y GA ₃ modifican los contenidos de antocianos en bayas de plantas de vid	88
5.3.5 Las aplicaciones con ABA y GA ₃ modifican los contenidos de antocianos en hojas de plantas de vid	90

5.3.6 Las aplicaciones con ABA y GA ₃ modifican los contenidos de PBPM en hojas de plantas de vid	92
5.3.7 Las aplicaciones con ABA y GA ₃ modifican los contenidos de PBPM en bayas de plantas de vid	94
5.3.8 Las aplicaciones con ABA y GA ₃ modifican los contenidos de PBPM en raíces de plantas de vid	96
5.3.9 Las aplicaciones con ABA y GA ₃ modifican los contenidos de terpenos en hojas de plantas de vid	98
5.3.10 Las aplicaciones con ABA y GA ₃ modifican los contenidos de terpenos en bayas de plantas de vid.	101
5.3.11 Las aplicaciones con ABA y GA ₃ modifican los contenidos de terpenos en raíces de plantas de vid	102
5.4 Discusión.....	105
Capítulo 6: Discusión general	108
6.1 Discusión general.....	109
6.2 Conclusiones y perspectivas futuras	112
Capítulo 7: Bibliografía citada.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Molécula de (+)-*cis*-ácido abscísico 3
- Figura 1.2.** Esquema general de la señalización mediada por ABA a través de los receptores citosólicos y nucleares. ABCG: transportador de ABA; PYR: receptor citosólico y nuclear de ABA; PP2C: proteína fosfatasa 2C; SnRK2: proteína quinasa; MAPKs: proteínas quinasas; CDPK: proteína quinasa dependiente de Ca²⁺; ABI3, ABI4, ABI5, CAMTA: factores de transcripción; ABRE: región promotora de reconocimiento de factores de transcripción en respuesta a ABA; P: fosfato inorgánico; A⁻: aniones. 9
- Figura 1.3.** Esquema general de la señalización mediada por ABA a través de los receptores de membrana. GTG: receptor de membrana de ABA; α , β , γ : subunidades de la proteína G asociada al receptor GTG; GDP: guanosina difosfato; GTP: guanosina trifosfato; PP1, PP2A: proteínas fosfatasas; PLD: fosfolipasa D; PLC: fosfolipasa C; PA: ácido fosfatídico; PIP₂: fosfatidil inositol bifosfato; IP₃: inositol trifosfato; DAG: diacil glicerol; MAPKs: proteínas quinasas; CDPK: proteína quinasa dependiente de Ca²⁺; ABI5, CAMTA: factores de transcripción; ABRE: región promotora de reconocimiento de factores de transcripción en respuesta a ABA; P: fosfato inorgánico; A⁻: aniones; c: colina; REL: retículo endoplasmático liso. 10
- Figura 1.4.** Estructura de las giberelinas. (A), *ent*-giberelano; (B), GA₁, (C), GA₃ y (D), GA₄. 11
- Figura 1.5.** Esquema general de la ruta de la biosíntesis de las giberelinas activas GA₁, GA₃ y GA₄. GGPP: geranylgeranyl difosfato; CPS: *ent*-copalil difosfato sintasa; KS: *ent*-kaureno sintasa; KO: *ent*-kaureno oxidasa; KAO: *ent*-kaurenoico oxidasa; GA13 ox: GA13 oxidasa; GA20 ox: GA20 oxidasa; GA3 ox: GA3 oxidasa; RER: retículo endoplasmático rugoso. 13
- Figura 1.6.** Esquema general del catabolismo de las giberelinas. GA2 ox: GA2 oxidasas; P450 monox: P450 monooxigenasa; GAMTA: GA metil transferasa. Las flechas violetas indican las reacciones catalizadas por GA2 ox sobre giberelinas que presentan 20 carbonos; las flechas rojas indican las reacciones catalizadas por GA2 ox sobre giberelinas que presentan 19 carbonos; las flechas verdes indican las reacciones catalizadas por GAMTA; las flechas naranjas indican la formación reversible de GA-glucosil esterres; las flechas celestes indican la formación de 16 α , 17 dihidrodioles. 15
- Figura 1.7.** Modelo de degradación de las proteínas represoras DELLA, mediada por giberelinas (GA) mediante el proteosoma 26 S. GID1: receptor de GA; Ub: ubiquitina; SLY1/GID2, SKP1, CUL1, E3: complejo E3 ubiquitin ligasa. 16
- Figura 1.8.** Modelo general de señalización por giberelinas. DELLA: proteína represora de giberelinas (GA); PIF: factor de transcripción promotor del crecimiento. 17
- Figura 2.1.** Gráfico de correlación entre área foliar y el largo de nervadura. Se muestra el modelo de regresión y el R². 28

Figura 2.2. Efecto de ABA y GA₃ sobre la fotosíntesis y conductancia estomática en *Vitis vinifera* L. cv. Malbec. (A), conductancia estomática expresada por unidad de área (g_s , mmol H₂O m⁻² s⁻¹); (B), fotosíntesis neta expresada por unidad de área (Pn, μmol CO₂ m⁻² s⁻¹); (C), conductancia estomática expresada por unidad de planta entera (g_s , mmol H₂O planta⁻¹ s⁻¹); (D), fotosíntesis neta expresada por unidad de planta entera (Pn, μmol CO₂ planta⁻¹ s⁻¹) medidas desde los 57 hasta los 62 DDA (días después de anthesis). Los valores corresponden a las medias ± EE, n=8. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada momento de cada tratamiento (p < 0,05). 32

Figura 2.3. Efecto de ABA y GA₃ sobre la densidad estomática en *Vitis vinifera* L. cv. Malbec. (A), densidad estomática (DE, n° de estomas mm⁻²) en hojas de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=16. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). Fotografías de improntas; (B), control; (C), ABA; (D), GA₃. 33

Figura 2.4. Pigmentos fotosintéticos (Unidades SPAD) en hojas de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec medidos a los 62 DDA. Los valores corresponden a medias ± EE, n=8. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). 33

Figura 2.5. Efecto de ABA y GA₃ sobre el peso seco total y la distribución de fotoasimilados en *Vitis vinifera* L. cv. Malbec. (A), peso seco total (g) y (B), distribución del peso seco (% de PS) en las diferentes partes de la planta de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). 34

Figura 3.1. Recta de correlación entre concentración de almidón (ppm) y la absorbancia a 610 nm. Se muestra el modelo de regresión y el R². 43

Figura 3.2. Recta de correlación entre concentración de proteínas totales (μg) y la absorbancia a 595 nm. Se muestra el modelo de regresión y el R². 44

Figura 3.3. Recta de correlación entre concentración de maltosa (μg) y la absorbancia a 540 nm. Se muestra el modelo de regresión y el R². 45

Figura 3.4. Fotografías de las secciones transversales correspondientes a (A-C), nervadura central de hojas; (D-F), pedicelo de bayas y (G-I), tallo de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec tomadas en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). (A), (D), (G), control; (B), (E), (H), ABA; (C), (F), (I), GA₃. La barra de escala corresponde a 100 μm, excepto en las fotografías de las secciones transversales de pedicelos de bayas que corresponden a 50 μm. x: xilema; f: floema. 48

Figura 3.5. Efecto de ABA y GA₃ sobre el contenido de azúcares solubles en hojas (μg cm⁻²). Las determinaciones fueron realizadas en pre-envero (30 DAA), envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-envero (130 DAA). Contenido de (A), sacarosa; (B), 49

glucosa; (C), fructosa; (D), inositol. Los valores corresponden a las medias \pm EE, n=4. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada momento de cada tratamiento ($p < 0,05$). 49

Figura 3.6. Efecto de ABA y GA₃ sobre el contenido de ácidos orgánicos en hojas ($\mu\text{g cm}^{-2}$). Las determinaciones fueron realizadas en pre-verano (30 DAA), verano (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-verano (130 DAA). Contenido de (A), ácido málico; (B), ácido tartárico; (C), ácido cítrico. Los valores corresponden a las medias \pm EE, n=4. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada momento de cada tratamiento ($p < 0,05$). 50

Figura 3.7. Efecto de ABA y GA₃ sobre el contenido de azúcares solubles en bayas (mg baya^{-1}). Las determinaciones fueron realizadas en pre-verano (30 DAA), verano (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-verano (130 DAA). Contenido de (A), sacarosa; (B), glucosa; (C), fructosa. Los valores corresponden a las medias \pm EE, n=4. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada momento de cada tratamiento ($p < 0,05$). 51

Figura 3.8. Efecto de ABA y GA₃ sobre el contenido de ácidos orgánicos en bayas (mg baya^{-1}). Las determinaciones fueron realizadas en pre-verano (30 DAA), verano (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-verano (130 DAA). Contenido de (A), ácido málico; (B), ácido tartárico; (C), ácido cítrico. Los valores corresponden a las medias \pm EE, n=4. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada momento de cada tratamiento ($p < 0,05$). 52

Figura 3.9. Efecto de ABA y GA₃ sobre (A) contenido de almidón en hojas ($\mu\text{g cm}^{-2}$) y (B) actividad amilasa ($\mu\text{M maltosa mg}^{-1} \text{ proteínas min}^{-1}$). Las mediciones fueron realizadas en verano (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 53

Figura 3.10. Efecto de ABA y GA₃ sobre la conductividad hidráulica de los tallos (k_{max} , $\text{Kg m}^{-1} \text{ MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Las mediciones fueron realizadas en verano (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 53

Figura 3.11. Efecto de ABA y GA₃ sobre el potencial agua de las plantas en preamanecer (Ψ_{wplanta} , MPa). Las mediciones fueron realizadas a los 62 DDA. Los valores corresponden a medias \pm EE, n=8. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 54

Figura 4.1. Efecto de ABA y GA₃ sobre la expresión de genes que codifican para transportadores de azúcares e invertasas medidas en hojas en verano (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Se muestran las expresiones relativas de (A), VvHT1; (B), VvHT3; (C), VvHT5; (D), VvHT6; (E) VvSUC12; (F) VvSUC27; (G) VvGIN1; (H), VvcwINV. Los

valores corresponden a medias de 4 repeticiones biológicas y tres técnicas \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada tratamiento y el control mediante la prueba de permutación ($p < 0,05$). Todos los valores fueron normalizados utilizando el gen endógeno *VvEF 1- α* . 67

Figura 4.2. Efecto de ABA y GA₃ sobre la expresión de genes que codifican para transportadores de hexosas medidas en bayas en pre-envero (30 DDA), envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-envero (130 DDA). Se muestran las expresiones relativas a lo largo del desarrollo de la baya de (A), *VvHT1*; (B), *VvHT2*; (C), *VvHT3*; (D), *VvHT5*; (E), *VvHT6*. Los valores corresponden a medias de 4 repeticiones biológicas y tres técnicas \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada tratamiento y el control mediante la prueba de permutación ($p < 0,05$). Todos los valores fueron normalizados utilizando el gen endógeno *VvEF 1- α* y se utilizó la muestra control pre-envero como muestra de referencia. 69

Figura 4.3. Efecto de ABA y GA₃ sobre la expresión de genes que codifican para transportadores de sacarosa medidas en bayas en pre-envero (30 DDA), envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-envero (130 DDA). Se muestran las expresiones relativas a lo largo del desarrollo de la baya de (A), *VvSUC27*; (B), *VvSUC12*. Los valores corresponden a medias de 4 repeticiones biológicas y tres técnicas \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada tratamiento y el control mediante la prueba de permutación ($p < 0,05$). Todos los valores fueron normalizados utilizando el gen endógeno *VvEF 1- α* y se utilizó la muestra control pre-envero como muestra de referencia. 70

Figura 4.4. Efecto de ABA y GA₃ sobre la expresión de genes que codifican para invertasas medidas en bayas en pre-envero (30 DDA), envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-envero (130 DDA). Se muestran las expresiones relativas a lo largo del desarrollo de la baya de (A), *VvGIN1*; (B), *VvcwINV*. Los valores corresponden a medias de 4 repeticiones biológicas y tres técnicas \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada tratamiento y el control mediante la prueba de permutación ($p < 0,05$). Todos los valores fueron normalizados utilizando el gen endógeno *VvEF 1- α* y se utilizó la muestra control pre-envero como muestra de referencia. 70

Figura 4.5. Mapa de temperatura en los tres estadios fenológicos de la baya, pre-envero (30 DDA), envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-envero (130 DDA). El color rojo indica alta expresión, mientras que el color verde indica baja expresión. 71

Figura 5.1. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de aminoácidos libres (AA, ng mg⁻¹ PF) medida en hojas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado. 83

Figura 5.2. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de aminoácidos libres (expresada en %) en hojas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control,

a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃).
84

Figura 5.3. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de aminoácidos libres (AA, ng mg⁻¹ PF) medida en hollejos de bayas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). nd: no detectado. 85

Figura 5.4. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de aminoácidos libres (expresada en %) en hollejos de bayas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). 86

Figura 5.5. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de aminoácidos libres (AA, ng mg⁻¹ PF) medida en raíces de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). nd: no detectado. 87

Figura 5.6. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de aminoácidos libres (expresada en %) en raíces de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). 88

Figura 5.7. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de antocianos (µg mg⁻¹ PF) medidos en hollejos de bayas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). nd: no detectado; Del-3-G: Delfinidina-3-Glucósido; Cia-3G: Cianidina-3-Glucósido; Pet-3-G: Petunidina-3-Glucósido; Peo-3-G: Peonidina-3-Glucósido; Mal-3-G: Malvidina-3-Glucósido; Del-3-acet: Delfinidina-3-acetilada; Cia-3-acet: Cianidina-3-acetilada; Pet-3-acet: Petunidina-3-acetilada; Peo-3-acet: Peonidina-3-acetilada; Mal-3-acet: Malvidina-3-acetilada; Del-3-p cum: Delfinidina-3-p cumarilada; Cia-3-p cum: Cianidina-3-p cumarilada; Pet-3-p cum: Petunidina-3-p cumarilada; Peo-3-p cum: Peonidina-3-p cumarilada; Mal-3-p cum: Malvidina-3-p cumarilada. 89

Figura 5.8. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de antocianos (expresada en %) en hollejos de bayas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Del-3-G: Delfinidina-3-Glucósido; Cia-3G: Cianidina-3-Glucósido; Pet-3-G: Petunidina-3-Glucósido; Peo-3-G: Peonidina-3-Glucósido; Mal-3-G: Malvidina-3-Glucósido; Del-3-acet: Delfinidina-3-acetilada; Cia-3-acet: Cianidina-3-acetilada; Pet-3-acet: Petunidina-3-acetilada; Peo-3-acet: Peonidina-3-acetilada; Mal-3-acet: Malvidina-3-acetilada; Del-3-p cum: Delfinidina-3-p cumarilada; Cia-3-p cum: Cianidina-3-p cumarilada; Pet-3-p cum: Petunidina-3-p cumarilada; Peo-3-p cum: Peonidina-3-p cumarilada; Mal-3-p cum: Malvidina-3-p cumarilada. 90

Figura 5.9. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de antocianos ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PF) medidos en hojas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado; Del-3-G: Delfinidina-3-Glucósido; Cia-3G: Cianidina-3-Glucósido; Pet-3-G:Petunidina-3-Glucósido; Peo-3-G: Peonidina-3-Glucósido; Mal-3-G: Malvidina-3-Glucósido; Cia-3-p cum: Cianidina-3-p cumarilada; Peo-3-p cum: Peonidina-3-p cumarilada; Mal-3-p cum: Malvidina-3-p cumarilada. 91

Figura 5.10. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de antocianos (expresada en %) en hojas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Del-3-G: Delfinidina-3-Glucósido; Cia-3G: Cianidina-3-Glucósido; Pet-3-G:Petunidina-3-Glucósido; Peo-3-G: Peonidina-3-Glucósido; Mal-3-G: Malvidina-3-Glucósido; Cia-3-p cum: Cianidina-3-p cumarilada; Peo-3-p cum: Peonidina-3-p cumarilada; Mal-3-p cum: Malvidina-3-p cumarilada. 92

Figura 5.11. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de polifenoles de bajo peso molecular (PBPM, $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) medidos en hojas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 93

Figura 5.12. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de polifenoles de bajo peso molecular (expresada en %) en hojas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). 94

Figura 5.13. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de polifenoles de bajo peso molecular (PBPM, $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) medidos en hollejos de bayas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 95

Figura 5.14. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de polifenoles de bajo peso molecular (expresada en %) en hollejos de bayas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). 96

Figura 5.15. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de polifenoles de bajo peso molecular (PBPM, $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) medidos en raíces de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 97

Figura 5.16. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de polifenoles de bajo peso molecular (expresada en %) en raíces de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). 98

Figura 5.17. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de terpenos (expresada en %) en hojas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). 100

Figura 5.18. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de terpenos (expresada en %) en hollejos de bayas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). 102

Figura 5.19. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de terpenos (expresada en %) en raíces de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). 103

Figura 6.1. Modelo de transporte de carbono en plantas de vid a partir del inicio de la maduración (envero). S: sacarosa; Pi: fosfato inorgánico; Hx: hexosas; VvcwINV: enzima invertasa de pared celular; VvGIN1: enzima invertasa vacuolar. 111

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.1.** Proteínas DELLA y los factores de transcripción que participan de algunos procesos fisiológicos mediados por GAs en Arabidopsis. 17
- Cuadro 2.1.** Parámetros de crecimiento de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec medidos a los 62 DAA. Los valores corresponden a medias \pm EE, n=8. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). LB: largo del brote; LE: Largo del entrenudo; AFT: área foliar total; PEH: peso específico de hojas. 31
- Cuadro 3.1.** Área del floema de la nervadura central de las hojas, del pedicelo de bayas y del tallo de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec medidas en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 47
- Cuadro 3.2.** Área del xilema de la nervadura central de las hojas, del pedicelo de bayas y del tallo de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec medidas en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). También se muestran los valores del área del poro de los vasos xilemáticos de tallos. Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 47
- Cuadro 4.1.** Secuencias y eficiencias de cebadores de los genes utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real. 64
- Cuadro 5.1.** Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de monoterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en hojas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado. 99
- Cuadro 5.2.** Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de sesquiterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en hojas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado. 99
- Cuadro 5.3.** Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de triterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en hojas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado. 100
- Cuadro 5.4.** Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de mono- y sesquiterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en hollejos de bayas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras

distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado. 101

Cuadro 5.5. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de triterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en hollejos de bayas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado. 101

Cuadro 5.6. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de sesqui- y triterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en raíces de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado. 104

ABREVIATURAS

AA: aminoácidos libres

AAO: ABA aldehído oxidasa

ABA: ácido abscísico

ABA-GE: ABA-glucosil éster

ABF/AREB: factor de transcripción de respuesta a ABA que se une a los dominios ABRE

ABI: proteína ABA insensible

ABRE: elementos de respuesta a ABA

AF: ácido fórmico

AFT: área foliar total

ANA: ácido naftalen acético

AO: aldehído oxidasa

AOG: ABA glucosiltransferasa

AP2/ERF: factor de transcripción APETALA2/ETILENO

ASR: factor de transcripción inducido por ABA, estrés y maduración

AtABCG25: proteína importadora de ABA del tipo ABC de *Arabidopsis thaliana*

AtABCG40: proteína exportadora de ABA del tipo ABC de *Arabidopsis thaliana*

AtSTP1: gen de *Arabidopsis thaliana* que codifica para un transportador de azúcar

BSA: suero de albúmina bovina

bZIP: factor de transcripción que presenta el dominio de unión al ADN rico en aminoácidos básicos como arginina y lisina

cADN: ADN copia

CAMTA: factor de transcripción de unión a calmodulina

CDPKs: proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+}

CHS: chalcona sintasa

CPS: *ent*-copalil difosfato sintasa

cv: cultivar

DAG: diacil glicerol

DDA: días después de antesis

DELLAs: proteínas represoras de giberelinas

DMSO: dimetilsulfóxido

DNS: 3,5-dinitrosalicílico

DO: densidad óptica

DPA: ácido dihidrofaseico

DPX: medio de montado a base de resina

DST: transportador de disacárido

DXF: 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato

DXS: DXF sintasa

EE: error estándar

ES: estilbeno sintasa

EST: fragmento de secuencia expresada

FDS: fitoeno desaturasa

FS: fitoeno sintasa

GA₃: ácido giberélico

GAI: giberelina insensible

GAMTA: GA metil transferasas

GAPDHs: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasas

GAs: giberelinas

GC-FID: cromatografía de gases acoplada a detección por ionización de llama

GC-MS: cromatógrafo gaseoso asociado a un espectrómetro de masa

GDP: guanosina difosfato

GFP: proteína fluorescente

GGPF: geranylgeranyl pirofosfato

GID: receptor de giberelinas

GPA1: subunidad α de la proteína G de *Arabidopsis thaliana*

GPCRs: receptores de membrana de ABA acoplados a proteína G como GTG1 y GTG2

GS: glutamina sintetasa

GTP: guanosina trifosfato

HPLC-MWD: cromatógrafo líquido asociado a un detector de múltiples longitudes de onda

INV: Instituto Nacional de Viticultura

IP₃: inositol 1,4,5 trifosfato

IPP: isopentenil pirofosfato

IRGA: analizador de gases por infrarrojo

KAO: *ent*-kaurenoico oxidasas

KAT1: canal iónico de ingreso de K⁺

KO: *ent*-kaureno oxidasa

KS: *ent*-kaureno sintasa

LB: largo del brote

LE: largo de entrenudo

MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MeCN: acetonitrilo

MEP: vía del metil-eritritol-fosfato

MEV: vía del ácido mevalónico

Moco: cofactor Molibdeno

MST: transportador de monosacárido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaOAc: acetato de sodio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NCED: 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa

neo PA: ácido neofaseico

NIST: National Institute of Standards and Technology

ODDs: dioxigenasas solubles dependientes de 2-oxoglutarato

PAC: ácido faseico

PA: ácido fosfatídico

PAL: fenilalanina amonio liasa

PBPM: polifenoles de bajo peso molecular

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEH: peso específico de hojas

PF: peso fresco

PGR: reguladores de crecimiento

PIF: factor de transcripción de interacción con fitocromos

PIP₂: fosfatidil inositol 4,5 bifosfato

PLC: fosfolipasa C

PLD: fosfolipasa D

Pn: fotosíntesis neta

PP1: proteína fosfatasa 1

PP2A: proteína fosfatasa 2A

PP2Cs: proteínas fosfatasas 2C

PS: peso seco

PSA: mezcla de aminas primarias y secundarias

PSII: fotosistema II

PVPP: polivinilpolipirrolidona

PYR/PYL/RCAR: Receptores nucleares y citosólicos de ABA

REL: retículo endoplasmático liso

RER: retículo endoplasmático rugoso

RGA: represor de giberelina

RGAL: análogo del represor de giberelina

ROS/EROS: especies reactivas del oxígeno

SCF: complejo proteico de la enzima E3 ubiquitin ligasa

SDR: alcohol deshidrogenasa

SLAC: canal iónico de egreso de aniones

SnRK2s: proteínas quinasas relacionadas a sacarosa 2

SoSUT1: transportador de sacarosa de *Spinacia oleracea*

SPE: extracción en fase sólida

SPS: sacarosa fosfato sintasa

SS: sacarosa sintasa

SURE: elemento de respuesta a azúcares

TMT: transportador tonoplástico de monosacárido

TPS: terpeno sintasas

VvcwINV: gen de *Vitis vinifera* que codifica para invertasa de pared celular

VvEF-1α: gen de *Vitis vinifera* que codifica para el factor de elongación 1-α

VvGIN: gen de *Vitis vinifera* que codifica para invertasa vacuolar

VvHT: gen de *Vitis vinifera* que codifica para transportador de hexosa

VvSUC: gen de *Vitis vinifera* que codifica para transportador de sacarosa

ZEP: zeaxantina epoxidasa

SÍMBOLOS

$\Delta P = \Delta \Psi_p$: diferencia del potencial de turgencia

g_s : conductancia estomática

K_m : constante de Michaelis-Menten

k_{max} : conductividad hidráulica máxima de tallos

$P_{destino}$: potencial de turgencia del destino

P_{fuente} : potencial de turgencia de la fuente

V_{max} : velocidad máxima de la reacción

Ψ_o : presión osmótica

$\Psi_{w_{planta}}$: potencial agua de las plantas

RESUMEN

La calidad de los vinos es dependiente de la calidad de las bayas, y ésta, a su vez, es dependiente de la acumulación y metabolismo de azúcares. Se conoce que el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas (GAs) regulan la acumulación de carbohidratos en muchos cultivos de importancia económica, pero los mecanismos por los cuales sucede aún se desconocen. El trabajo desarrollado en la presente tesis tuvo como objetivo principal determinar si la mayor concentración de azúcares en bayas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec, mediada por ABA y GAs, se debe a una modificación en la carga floemática de órganos fuentes (hojas), en el área del floema y/o en la expresión de genes que codifican para transportadores de azúcares. Para lograr el objetivo propuesto, se planteó un experimento con plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec en macetas sometidas a condiciones de campo y asperjadas con ABA (250 mg L⁻¹) y ácido giberélico (GA₃, 500 mg L⁻¹). Se midieron variables de crecimiento, fisiológicas, bioquímicas, anatómicas y expresión de genes. En ambos tratamientos se observó una mayor concentración de sacarosa en las hojas, en enero, y una disminución significativa en la expresión relativa de los genes que codifican para transportadores de azúcares en dicho tejido. Además, las plantas tratadas con GA₃ presentaron un crecimiento exacerbado de la parte aérea coincidente con una mayor partición de fotoasimilados hacia el tallo de las mismas. Por su parte las aplicaciones con ABA favorecieron el transporte de carbono hacia las bayas durante enero, coincidente con la sobre-expresión de los genes *VvHT2*, *VvHT3* y *VvHT6*. Debido a este comportamiento diferencial, el tratamiento con ABA aceleró el inicio de la maduración de las bayas mientras que el tratamiento con GA₃ lo retrasó. Contrariamente, las bayas tratadas con GA₃ mostraron las mayores concentraciones de monosacáridos en post-enero, en correlación con la sobre-expresión de los genes *VvHT2* y *VvHT3*. Por otro lado, ambos tratamientos incrementaron el área del floema y xilema en la nervadura central de las hojas, en tallos y en el pedicelo de las bayas. Como conclusión, se postula que la estimulación del transporte de carbono hacia las bayas y tallos mediada por ABA y GA₃ respectivamente, fue producto de modificaciones en la concentración de carbohidratos no estructurales en hojas, en el área del tejido floemático como así también de la expresión de los transportadores de azúcares en las bayas.

PALABRAS CLAVES: ABA, GA₃, transporte de azúcares, floema, xilema

“Effect of abscisic acid and gibberellin A₃ on vascular tissues and the expression of sugar transporters in grapevine plants (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec”

ABSTRACT

Grape quality for winemaking depends on sugar accumulation and metabolism in berries. Abscisic acid (ABA) and Gibberellins (GAs) have been reported to control sugar allocation in economically important crops, although the mechanisms involved are still unknown. The current study tested if ABA and Gibberellin A₃ (GA₃) enhance carbon allocation in fruits of grapevines by modifying phloem loading, phloem area and expression of sugar transporters in leaves and berries. Pot-grown *Vitis vinifera* L. cv. Malbec plants were sprayed with ABA (250 mg L⁻¹) and GA₃ (500 mg L⁻¹) solutions. Growth, physiological, anatomical, biochemical and molecular parameters, were measured. ABA- and GA₃-treatments showed an increase in leaf sucrose content at the stage of full veraison, and a significant down-regulation of gene expression of sugar transporters in leaves. Moreover, GA₃-treated grapevines showed an exacerbated vegetative growth coincident with a higher photoassimilate partitioning to the stem. Contrary, ABA applications increased carbon translocation from leaves to berries at full veraison, which was correlated with an up-regulation of *VvHT2*, *VvHT3* and *VvHT6*. In this sense, ABA hastened berry ripening whereas GA₃ delayed it. On the other hand, GA₃-treated berries showed the highest glucose and fructose content at post-veraison, related to an enhancement of *VvHT2* and *VvHT3* gene expression. Furthermore, both treatments increased phloem and xylem area in leaf, stem and berry pedicel. In conclusion, stimulation of sugar transport by ABA and GA₃ to berries and stems, respectively, was due to buildup of non-structural carbohydrates in leaves, modifications in phloem tissue, and modulation in gene expression of sugar transporters.

KEY WORDS: ABA, GA₃, sugar transport, phloem, xylem

Capítulo 1: Antecedentes, objetivos e hipótesis

Antecedentes

1.1 Hormonas vegetales

Las plantas, al ser organismos sésiles, necesitan valerse de un arsenal bioquímico para poder hacer frente a las condiciones adversas a las que pueden estar sometidas. Es por ello que precisan reconocer e interpretar las distintas señales ambientales y, una vez reconocidas, es necesario poder comunicarlas al resto de las células y/o tejidos de la planta para generar una respuesta que las hagan aptas al lugar en donde habitan.

Las hormonas vegetales, fitohormonas y más recientemente conocidas como reguladores de crecimiento (PGR, del inglés Plant Growth Regulators) son moléculas que actúan como señales endógenas en la planta y que utilizan las células para comunicarse entre ellas. Los PGR regulan los procesos celulares en células específicas de ciertos tejidos en momentos específicos de la vida de las mismas, regulando la expresión génica como así también la división y crecimiento celular. La palabra hormona proviene del griego que significa en movimiento, es decir que hace alusión a que las hormonas se sintetizan en un cierto tejido específico para luego moverse y realizar su acción en otro. Esta definición es correcta para los mamíferos, pero no así para las plantas ya que estas últimas carecen de glándulas en donde se llevan a cabo su síntesis; en cambio, se pueden sintetizar en un gran número de células y/o tejidos. Las hormonas vegetales cumplen múltiples funciones en las plantas como: controlar la formación de flores, hojas y tallos, la forma de las hojas, como así también el desarrollo y maduración de los frutos, entre otros.

Los PGR hasta ahora reconocidos por la comunidad científica se corresponden con los siguientes grupos: ácido abscísico, auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido salicílico, ácido jasmónico, brasinoesteroides, poliaminas y estrigolactonas.

1.1.1 Ácido abscísico

1.1.1.1 Características estructurales

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal que fue descubierta a comienzos de 1960 por dos grupos de investigación de forma independiente; uno en Gran Bretaña (Cornforth et al. 1965) y otro en USA (Ohkuma et al. 1963). Originalmente se pensaba que estaba involucrada en fenómenos fisiológicos tales como abscisión de hojas y frutos, como así también en la dormición de yemas en plantas leñosas. Sin embargo, en la actualidad, su rol en dichos procesos no está del todo claro y sí se lo involucra en el control de cierre de estomas y la elicitación de proteínas de defensa (Schwartz y Zeevaart 2009). Como se puede observar en la Figura 1.1, el ABA es una molécula de 15 átomos de C, en donde en el C1 presenta una función carboxilo lo que le da la capacidad de comportarse como un ácido débil ($pK_a = 4.7$). Asimismo, presenta un

doble enlace en el C2 generando isomería geométrica, siendo la forma *cis*, por convención, el isómero nombrado como ácido abscísico. Dado que el C1' del anillo es anomérico, la molécula también posee isomería óptica dando como resultado las formas R (-) y S (+). Ambos enantiómeros son biológicamente activos, siendo el isómero S (+) el responsable de las respuestas fisiológicas rápidas como el cierre estomático, mientras que el isómero R (-) está involucrado en respuestas fisiológicas de larga duración como la maduración de semillas (Taiz y Zeiger 1998).

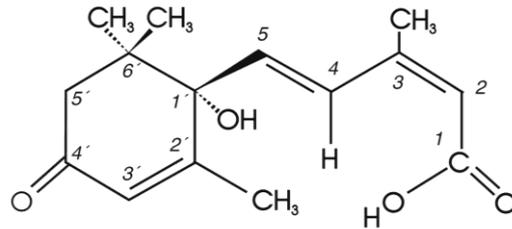


Figura 1.1. Molécula de (+)-*cis*-ácido abscísico

1.1.1.2 Efectos fisiológicos del ABA

El ABA es una fitohormona generalmente involucrada en la respuesta de las plantas al estrés (Dood y Davis 2005). En condiciones no estresantes de crecimiento, el ABA es mantenido a bajos niveles en las células vegetales. Asimismo, bajos niveles en el contenido de ABA son esenciales para mantener el normal crecimiento de las plantas, ya que plantas mutantes deficientes en esta hormona presentan un fenotipo achaparrado que revierte cuando se le aplica exógenamente ABA (Finkelstein y Rock 2002).

Cumple una importante función como regulador del cierre estomático en diferentes especies ante condiciones de estrés hídrico (Hartung y Davis 1991). Se ha observado en yerba mate (Sansberro et al. 2000, Sansberro et al. 2004), que esta disminución del estrés hídrico diurno al posibilitar una mayor turgencia, promueve el crecimiento en volumen, con el aumento consiguiente en la acumulación de materia seca. Esto se traduce en mayor crecimiento y un incremento en el largo de los tallos.

Inhibe la germinación prematura (viviparidad) mediante la supresión de sustancias de reserva (Bewley y Black 1994) e inhibe la expresión de genes que codifican para α -amilasas y proteasas durante el desarrollo de la semilla. Por otro lado, se la ha asociado con la expresión de genes relacionados al estrés tanto biótico como abiótico (Zeevart y Creelman 1988).

En vid, además de relacionarlo con el cierre estomático (Stoll 2000), se lo ha asociado con reducción del crecimiento vegetativo (Dry et al. 2000), inducción de síntesis de polifenoles (Ban et al. 2003, Jeong et al. 2004, Peppi et al. 2006, 2007) y acumulación de azúcares en bayas (Pan et al. 2005).

1.1.1.3 Metabolismo del ABA

El contenido de ABA en tejidos de plantas superiores está regulado tanto por la biosíntesis como por el catabolismo y la inactivación por conjugación de la molécula.

1.1.1.3.1 Biosíntesis del ABA

En plantas superiores, la síntesis de ABA se realiza a través de la vía “indirecta” del metil-eritritol-fosfato (MEP), en donde en una primera etapa se sintetizan carotenos (C40) que luego son clivados y oxidados, para después, en una segunda etapa, ser ciclados y oxidados nuevamente hasta obtener la molécula de ABA. La primera etapa, que comprende la síntesis de precursores carotenoides y la formación de xantofilas, se lleva a cabo en plastidios, mientras que la segunda etapa, donde ocurre la conversión de xantoxina a ABA, se realiza en el citosol (Seo y Koshiba 2002).

Si bien el ABA presenta 15 átomos de carbono, la vía directa a partir del precursor sesquiterpénico inmediato C15 farnesil pirofosfato solamente se ha observado en ciertos hongos fitopatógenos. Como se explicó anteriormente, en plantas superiores, el ABA proviene del clivaje de moléculas de C40, carotenos. Los carotenos, como otros isoprenoides, son sintetizados a partir del precursor C5 isopentenil pirofosfato (IPP). En plastidios, el IPP se forma a partir del 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXF) a través de una reacción catalizada por la enzima DXF sintasa (DXS). Luego, por adición de dos unidades de IPP se forma el terpeno C15 farnesil pirofosfato que mediante la adición de otra unidad de IPP se obtiene el C20 geranilgeranil pirofosfato (GGPF). La conversión del GGPF a C40 fitoeno es catalizada por la enzima fitoeno sintasa (FS). Luego, el fitoeno es convertido en ζ -caroteno a través de la enzima fitoeno desaturasa (FDS) para después formar licopeno, β -caroteno y finalmente la xantofila zeaxantina (Seo y Koshiba 2002, Nambara y Poll 2005).

El primer paso de la ruta de síntesis específica para la obtención de ABA es la formación de *trans*-violoxantina a través de zeaxantina (Seo y Koshiba 2002, Nambara y Poll 2005). La enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) es la que cataliza la reacción mediante una doble epoxidación continua, obteniéndose anteraxantina como intermediario. Hasta la fecha, se han aislado varios mutantes deficientes en la enzima ZEP en especies como *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. tales como *aba1*, *npq2* y *los6* (Koornneef et al. 1982, Niyogi et al. 1998, Merlot et al. 2002, Xiong et al. 2002); en *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tal como *aba2* (Marin et al. 1996) y en *Oryza sativa* L. tal como *osaba1* (Agrawal et al. 2001). Los mismos acumulan altas cantidades de zeaxantina y muestran una disminución significativa en los contenidos de ABA que se traduce en plantas que se marchitan rápidamente y producen semillas carentes de endodormición.

El siguiente paso es la conversión de *trans*-violoxantina a xantofilas como la 9-*cis*-violoxantina y su isómero la 9'-*cis*-neoxantina. Desafortunadamente, hasta el momento, no se ha podido aislar la enzima que cataliza dicha reacción. La biosíntesis continúa con el clivaje oxidativo de las xantofilas para obtener xantoxina, cuya reacción es llevada a cabo por la 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED, Schwartz et al. 2003). La NCED fue descubierta durante la caracterización del mutante vivíparo de maíz *vp14* (Schwartz et al. 1997, Tan et al. 1997) y más adelante, se comprobó que los mutantes de

Arabidopsis y tomate *nced3* (Iuchi et al. 2001) y *notabilis* (Burbidge et al. 1999) respectivamente, presentaban bajas concentraciones de ABA por ser deficientes en la proteína NCED. Actualmente, cADNes de *NCED* han sido clonados de diversas especies como poroto (*Phaseolus vulgaris* L., Qin y Zeevaart 1999), frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., Iuchi et al. 2000) y palta (*Persea americana* Mill., Chernys y Zeevaart 2000). Asimismo, en todas las especies, el gen *NCED* está conformado por una familia génica y se ha demostrado que la enzima NCED es clave en la biosíntesis de ABA.

Luego del clivaje de las 9-*cis*-epoxicarotenoides, la xantoxina es convertida en ABA en el citosol. Para ello, tres posibles rutas vía ABA aldehído, ácido xantóxico y ABA alcohol han sido propuestas (Seo y Koshiba 2002). La primera ruta, y la más estudiada, es llevada a cabo mediante dos enzimas. La primera presenta actividad alcohol deshidrogenasa (SDR) y es la responsable de la conversión de la xantoxina a ABA aldehído. La segunda, con actividad oxidasa llamada ABA aldehído oxidasa (AAO), cataliza la reacción de oxidación de ABA aldehído a ABA. Se han aislado plantas mutantes en el gen *SDR* en Arabidopsis como *aba2*, *gin1* *isi4* y *sis4* (Léon-Kloosterziel et al. 1996, Schwartz et al. 1997, Laby et al. 2000, Rook et al. 2001, Cheng et al. 2002). Por otro lado aquellas plantas mutantes de Arabidopsis y tomate tales como *aaa3* (Seo et al. 2000) y *sitiens* (Okamoto et al. 2002) respectivamente, son deficientes en ABA por presentar una alteración en la proteína AAO. Asimismo, es sabido que AAO necesita de un cofactor Molibdeno (Moco) en su forma sulfurada para poder ser activa. Es por ello que los mutantes de tomate (*flacca*, Sagi et al. 2002), *Nicotiana plumbaginifolia* (*aba1*, Akaba et al. 1998) y Arabidopsis (*aba3*, *los5* y *gin5*, Léon-Kloosterziel et al. 1996, Schwartz et al. 1997, Xiong et al. 2001, Cheng et al. 2002) presentan una disminución significativa en sus contenidos de ABA por ser incapaces de convertir el cofactor Molibdeno a su forma sulfurada.

La segunda ruta, vía ácido xantóxico, comprende el accionar de dos enzimas, la aldehído oxidasa (AO) y la alcohol deshidrogenasa (SDR). La primera cataliza la reacción de oxidación de xantoxina a ácido xantóxico mientras que la segunda deshidrogena y reduce el ácido xantóxico para dar como producto final ácido abscísico (Cowan 2000).

La tercera ruta, vía ABA alcohol, aparentemente está activa en aquellas plantas de tomate que tienen alterada la oxidación de ABA aldehído a ABA, tales como *flacca* y *sitiens*. En las mismas, ocurre una reacción de “by pass” en donde el ABA aldehído es reducido a ABA alcohol para luego ser oxidado a ABA. Se cree que esta ruta de síntesis es poco significativa en plantas silvestres, pero sería fundamental en aquellas plantas mutantes que tienen impedido la oxidación del ABA aldehído (Rock et al. 1991).

1.1.1.3.2 Catabolismo del ABA

Las plantas pueden ajustar los contenidos de ABA presente en sus tejidos mediante oxidación catabólica del ABA. Es bien sabido que los carbonos C-7', C-8' y C-9' de la estructura cíclica del ABA son factibles de oxidar formando 7'-hidroxi ABA, 8'-hidroxi ABA y 9'-hidroxi ABA respectivamente. Estos compuestos presentan una menor actividad biológica y son susceptibles a seguir oxidándose de forma espontánea hasta formar compuestos sin actividad biológica como son el ácido faseico (PAC), el ácido

dihidrofaseico (DPA) y el ácido neofaseico (neo PA, Nambara y Marion-Poll 2005). Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* han revelado que la enzima encargada de la oxidación del grupo metilo del C-8' es una enzima con actividad citocromo P450 monooxigenasa denominada ABA 8'-hidroxilasa codificada por el genes *CYP707A* (Krochko et al. 1998, Kushiro et al. 2004, Saito et al. 2004). Asimismo, se ha demostrado que dicha enzima es clave para la regulación del contenido de ABA mediante catabolismo oxidativo (Nambara y Marion-Poll 2005). Una vez que el ABA se hidroxila mediante la enzima ABA 8'-hidroxilasa, se isomeriza espontáneamente formando el PA; que a su vez pasa a la forma de DPA mediante una reacción catalizada por una enzima reductasa soluble (Gillard y Walton 1976, Milborrow et al. 1988, Krochko et al. 1998). Si bien la ruta catabólica correspondiente al 8'-hidroxi ABA es la más importante en plantas, se ha visto que los catabolitos 9'-hidroxi ABA y su isómero el neo PA son abundantes en semillas inmaduras de *Brassica napus* L. (Zhou et al. 2004). En contraposición, el compuesto 7'-hidroxi ABA ha sido encontrado en una gran variedad de especies como un catabolito minoritario del ABA (Zeevaart y Creelman 1988, Schwartz y Zeevaart 2009).

1.1.1.3.3 Conjugación del ABA

Los contenidos de ABA activo en plantas también pueden regularse a través de su conjugación con glucosa. Los grupos carboxilo e hidroxilos del ABA como de sus catabolitos son factibles de unirse con una molécula de glucosa mediante enlaces éster o éter respectivamente, siendo el compuesto ABA-glucosil éster (ABA-GE) el producto de conjugación mayoritario en el reino vegetal (Boyer y Zeevaart 1982). Una vez conjugados, se pueden acumular en vacuola para luego ser hidrolizados y de esta forma el ABA estará rápidamente disponible en las células para actuar en respuesta a algún estrés (Nambara y Marion-Poll 2005). Asimismo, se ha observado que el transporte de ABA a larga distancia, a través de xilema, se realiza en forma de ABA-GE (ABA inactivo, Hartung et al. 2002). Hasta el momento, se han caracterizado las enzimas que participan en el proceso de conjugación y desconjugación del ABA. La enzima ABA glucosiltransferasa (AOG) es la encargada de esterificar el ABA con una molécula de UDP-glucosa, mientras que la enzima responsable de su hidrólisis es la β -D-glucosidasa (Lehmann y Vlasov 1988, Dietz et al. 2000, Sauter et al. 2002, Xu et al. 2002).

1.1.1.4 Transporte del ABA

Se ha postulado que el transporte de ABA a larga distancia desde su sitio de biosíntesis hasta su sitio de acción, es debido a un balance entre el transporte pasivo y el transporte activo (Seo y Koshiba 2011). Dado que el ABA es un ácido débil con un $pK_a=4.7$, la molécula puede trasladarse mediante difusión desde zonas de bajo pH a zonas con pH elevado. Es por ello que el ABA podría atravesar las membranas biológicas cuando se encuentra en su forma protonada (ABAH) debido al carácter hidrofóbico de su forma aniónica (ABA^- , Wilkinson 1999, Wilkinson y Davies 2002, Seo y Koshiba 2011). Asimismo, se conoce que al generarse un estrés hídrico en la planta, el pH del apoplasto como así también del flujo xilemático incrementan considerablemente (Wilkinson 1999, Wilkinson y Davies 2002). Por tal razón, el ABA, que se encuentra en el citoplasma de las células de la raíz, puede difundir libremente como ABAH hacia el apoplasto y luego hacia los vasos del xilema. Una vez allí, queda retenido como ABA^- impidiendo su

ingreso a las demás células. Debido a la fuerza transpiratoria, la molécula es transportada junto con el flujo xilemático desde la raíz hacia el apoplasto del mesofilo de las hojas (Seo y Koshiba 2011).

Al llegar a las hojas, el ABA puede ejercer su acción al ser reconocido por receptores localizados tanto en membranas plasmáticas como en el interior de las células. En *Arabidopsis*, las proteínas GTG1 y GTG2, que tienen la capacidad de interactuar con la subunidad α de la proteína G (GPA1), son los principales receptores a nivel de membrana plasmática (Pandey et al. 2009). Por otro lado, las proteínas PYR/PYL/RCAR son las encargadas de reconocer a la molécula de ABA en el citoplasma y en el núcleo (Park et al. 2009). En el segundo caso, el ABA debe ingresar al interior de las células para ejercer su acción. En este punto es cuando entran en consideración los transportadores de ABA, ya que el modelo de transporte pasivo no puede explicar el ingreso de la molécula desde el apoplasto al interior de la célula. Además, la gran concentración de ABA-GE en el flujo xilemático de plantas con estrés hídrico tampoco es explicada por el transporte pasivo, ya que la molécula de ABA-GE, al ser extremadamente polar, no puede atravesar libremente la membrana plasmática (Seo y Koshiba 2011).

En *Arabidopsis* se han identificado dos transportadores del tipo ABC que serían los responsables del transporte activo del ABA. Kuromori et al. (2010) encontraron que la proteína AtABCG25 es la responsable de exportar el ABA desde el interior celular hacia el espacio apoplástico, mientras que Kang et al. (2010) reportaron que la proteína AtABCG40 es la responsable de importar ABA desde el apoplasto hacia el citoplasma.

Si bien se ha explicado el transporte de ABA desde la raíz “sitio de síntesis” hacia las hojas “sitio de acción”, no es la única forma que poseen las plantas para generar una respuesta mediada por ABA a un estrés abiótico. Dado que el ABA puede ser sintetizado *in situ* en por ej. células oclusivas, las mismas pueden compartimentalizarse en vacuolas bajo su forma glicosilada (ABA-GE, inactiva, Sauter et al. 2002). Al generarse un estrés hídrico, las moléculas de ABA-GE se hidrolizan formando ABA que abandonan vacuolas para ejercer su respuesta, sucediendo en este caso el cierre estomático (Lee et al. 2006, Priest et al. 2006). Por lo que el ABA proveniente de las raíces actuaría como refuerzo del ABA presente en las hojas para mediar una respuesta a largo plazo y no estaría involucrada en una respuesta inmediata. Por otro lado, el ABA proveniente de las raíces podría comportarse como señal del estrés hídrico generando la síntesis *de novo* o la hidrólisis del ABA-GE presente en las hojas (Seo y Koshiba 2011).

1.1.1.5 Señalización del ABA

Como se explicó anteriormente, una vez que el ABA llega hasta su sitio de acción debe ser reconocido para que la planta responda a la situación de estrés. Se han identificado receptores de ABA tanto en plasmalema como en el interior de la célula. Dentro de los primeros se encuentran las proteínas GPCRs (del inglés, G-protein-coupled receptors) como GTG1 y GTG2 (Pandey et al. 2009), mientras que en los segundos se encuentran los receptores PYR/PYL/RCAR (del inglés PYRABACTIN RESISTANCE/PYRABACTIN RESISTANCE-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR, Ma et al. 2009, Park et al. 2009); éstos presentes tanto en el citoplasma como en el núcleo.

Cuando la molécula de ABA ingresa a la célula, a través del transportador ABCG40, se une al receptor PYR/PYL/RCAR. En ese momento, ocurre un cambio conformacional de la proteína PYR/PYL/RCAR que promueve el “reclutamiento” de la enzima PP2C formando un complejo inactivo (Ma et al. 2009, Park et al. 2009, Santiago et al. 2009). De esta forma las proteínas quinasas SnRK2s (del inglés SUCROSE NONFERMENTING-RELATED PROTEIN KINASE 2s) pueden ejercer su acción de fosforilación y activación enzimática (Mustilli et al. 2002, Umezawa et al. 2009). De otro modo, en ausencia de ABA, la actividad de las SnRK2s es inhibida por las proteínas fosfatasa PP2Cs (del inglés PROTEIN PHOSPHATASE 2Cs) tales como ABI1 y ABI2 (Park et al. 2009, Schweighofer et al. 2004). Se conoce que las enzimas SnRK2s son capaces de fosforilar a la proteína de membrana NADPH oxidasa, canales iónicos de ingreso de K^+ (KAT1) y egreso de aniones (SLAC) en células oclusivas, como así también factores de transcripción ABF/AREB (del inglés ABA-RESPONSE ELEMENT-BINDING FACTOR) o AP2/ERF (del inglés APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR) del tipo bZIP (del inglés basic/región leucine zipper) tales como ABI3, ABI4 y ABI5 (Furihata et al. 2006, Sirichandra et al. 2009, Hauser et al. 2011). Una vez activa, la enzima NADPH oxidasa promueve la formación de especies reactivas del oxígeno (EROS o ROS) como el H_2O_2 que es capaz de incrementar la $[Ca^{2+}]$ citosólico por activación de los canales Ca^{2+} de la membrana plasmática (Pei et al. 2000, Miao et al. 2006). Por otro lado, el H_2O_2 activa a las proteínas MAPKs que, a su vez, son capaces de fosforilar y activar a los canales aniónicos SLAC y factores de transcripción como ABI5 (Figura 1.2, Lu et al. 2002, Jammes et al. 2009). Tanto la inhibición como la activación de los canales de K^+ y de aniones respectivamente, son esenciales para el cierre estomático debido a una disminución del potencial osmótico de las células (Lee et al. 2009). Por su parte, una vez activos los factores de transcripción son capaces de unirse a los dominios ABREs (del inglés ABA-responsive elements) que se encuentran en la región promotora de los genes de respuesta a ABA, favoreciendo la transcripción de los mismos (Ezcurra et al. 2000).

Las oscilaciones en la $[Ca^{2+}]$ citosólico son protagonistas fundamentales en la señalización de ABA. El incremento conlleva a la activación de las proteínas CDPKs (del inglés Ca^{2+} -DEPENDENT PROTEIN KINASES) responsables de fosforilar a NADPH oxidasas, SLAC, KAT1 y factores de transcripción tales como ABI5 y CAMTAs (del inglés CALMODULIN-BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATORS), que también se unen a los dominios ABREs para regular positivamente la transcripción de genes de respuesta a ABA (Harmon et al. 2000, Mori et al. 2006, Choi et al. 2005, Kobayashi et al. 2007, Zhu et al. 2007, Geiger et al. 2010, Hauser et al. 2011). Además, el incremento de $[Ca^{2+}]$ lleva a la despolarización de la membrana de las células oclusivas que conduce a la pérdida de H_2O y posterior cierre estomático (Figura 1.2 y 1.3). La despolarización de la membrana es debido al efecto combinado del cierre de canales de K^+ , inhibición de las bombas de protones H^+ -ATPasas y a la estimulación de los canales aniónicos (Figura 1.2 y 1.3, Meimoun et al. 2009).

En forma paralela con los receptores citosólicos y nucleares, los receptores plasmáticos GTG1 y GTG2 intervienen en la transducción de la señal de ABA. Estos están asociados a proteínas G heterotriméricas, es decir, que están constituidos por 3 subunidades distintas denominadas α , β y γ . En Arabidopsis, la subunidad α se denomina GPA1. Cuando la molécula de ABA se acopla a los receptores, la proteína G se escinde en el monómero GPA1 y el dímero β,γ . Asimismo, la subunidad GPA1

intercambia una molécula de GDP (guanosina difosfato) por una molécula de GTP (guanosina trifosfato) para formar el efector activo (Pandey et al. 2009, Xu et al. 2013). Luego, GPA1-GTP activa a las enzimas fosfolipasas PLD α 1 (del inglés PHOSPHOLIPASE D) y PLC (Mishra et al. 2006). La primera va a membrana para hidrolizar fosfolípidos obteniendo ácido fosfatídico PA (del inglés PHOSPHATIDIC ACID) y colina (Zhang et al. 2009). El PA activa a la enzima NADPH oxidasa alostéricamente, y de esta forma genera ROS (del inglés REACTIVE OXYGEN SPECIES) que activará, a su vez, los canales Ca $^{2+}$ y a las proteínas MAPKs (Pei et al. 2000, Jammes et al. 2009, Zhang et al. 2009). Además, se ha encontrado que el PA inhibe la actividad de fosfatasa como PP1 y PP2A (Takemiya y Shimazaki 2010). Por otra parte, la enzima PLC utiliza como sustrato al fosfolípido fosfatidil inositol 4,5 bifosfato PIP $_2$ (del inglés PHOSPHATIDIL INOSITOL BIPHOSPHATE) para dar como productos al inositol 1,4,5 trifosfato IP $_3$ (del inglés INOSITOL TRIPHOSPHATE) y al diacil glicerol DAG (Staxen et al. 1999, Brault et al. 2004). Se ha visto que el IP $_3$ promueve la salida de Ca $^{2+}$ intracelular del retículo endoplasmático liso al unirse a receptores de IP $_3$ que se encuentran en los canales de Ca $^{2+}$, contribuyendo de esta forma al incremento de [Ca $^{2+}$] citosólico (Figura 1.3, Meimoun et al. 2009).

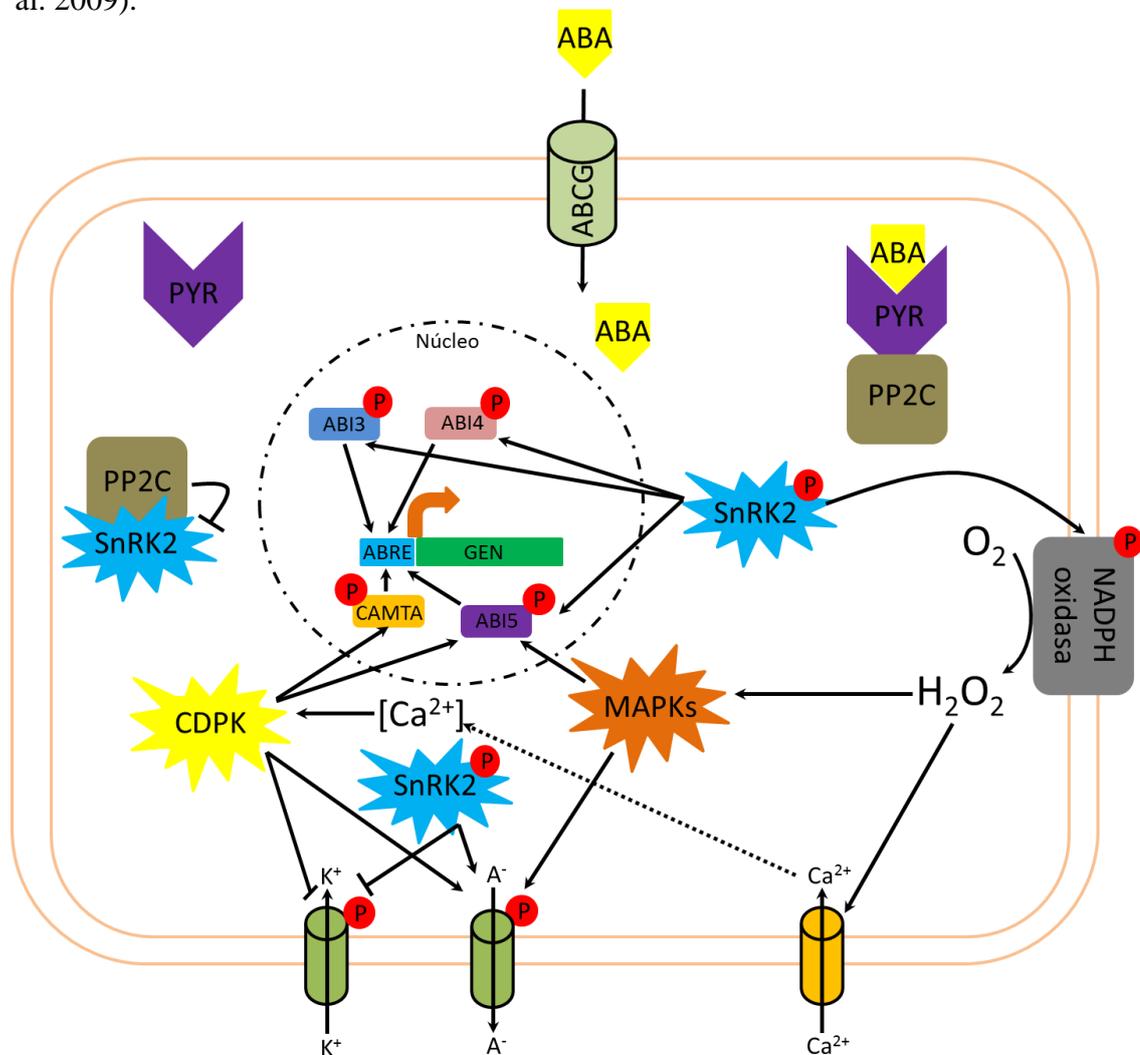


Figura 1.2. Esquema general de la señalización mediada por ABA a través de los receptores citosólicos y nucleares. ABCG: transportador de ABA; PYR: receptor citosólico y nuclear de ABA; PP2C: proteína fosfatasa 2C; SnRK2: proteína quinasa; MAPKs: proteínas quinasas; CDPK: proteína quinasa dependiente de Ca $^{2+}$; ABI3, ABI4, ABI5, CAMTA: factores de transcripción; ABRE: región promotora de reconocimiento de factores de transcripción en respuesta a ABA; P: fosfato inorgánico; A $^{-}$: aniones.

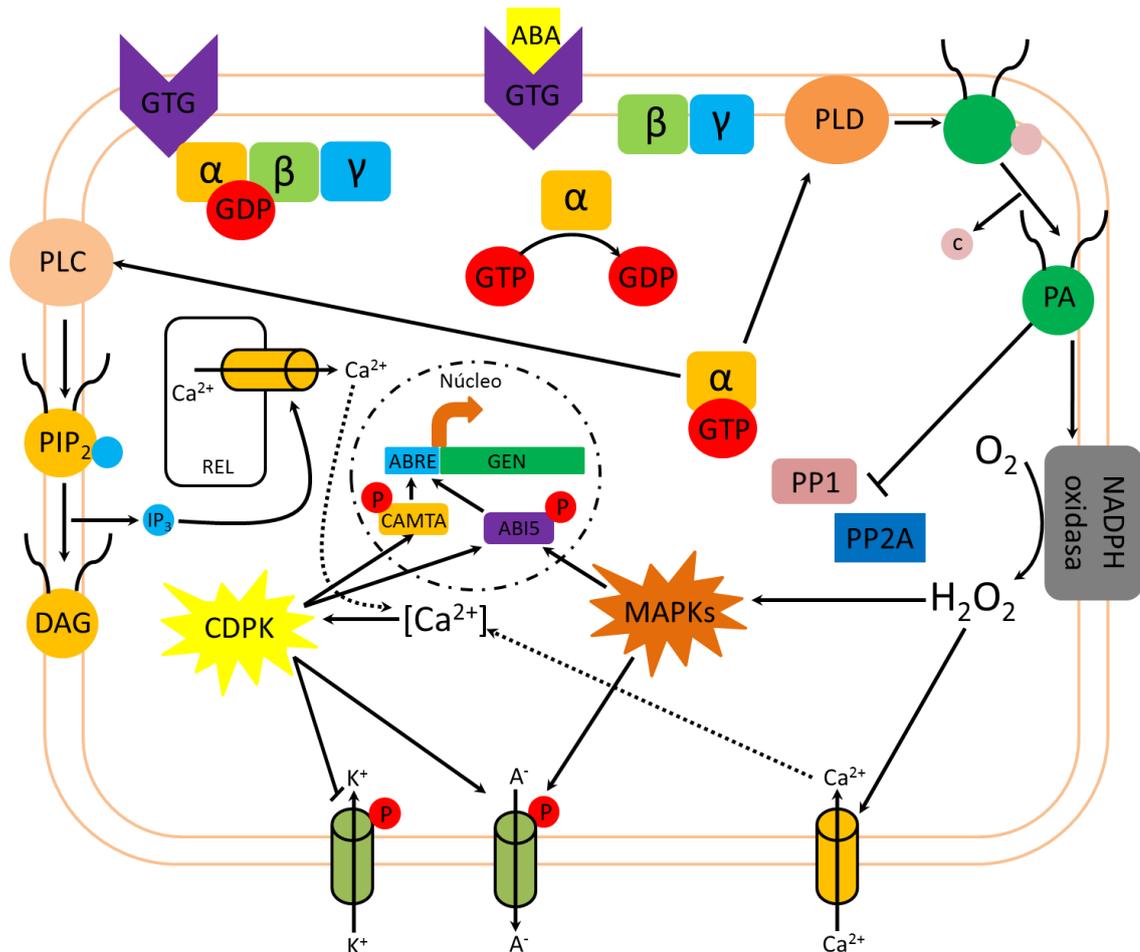


Figura 1.3. Esquema general de la señalización mediada por ABA a través de los receptores de membrana. GTG: receptor de membrana de ABA; α , β , γ : subunidades de la proteína G asociada al receptor GTG; GDP: guanosina difosfato; GTP: guanosina trifosfato; PP1, PP2A: proteínas fosfatasa; PLD: fosfolipasa D; PLC: fosfolipasa C; PA: ácido fosfatídico; PIP₂: fosfatidil inositol bifosfato; IP₃: inositol trifosfato; DAG: diacil glicerol; MAPKs: proteínas quinasas; CDPK: proteína quinasa dependiente de Ca²⁺; ABI5, CAMTA: factores de transcripción; ABRE: región promotora de reconocimiento de factores de transcripción en respuesta a ABA; P: fosfato inorgánico; A⁻: aniones; c: colina; REL: retículo endoplasmático liso.

1.1.2 Giberelinas

Las giberelinas (GAs) fueron descubiertas en el año 1926 por científicos japoneses y recibieron su nombre por el hongo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. Este patógeno ocasionaba grandes pérdidas en el rendimiento del cultivo del arroz por generar una enfermedad llamada *bakanae* que causaba un crecimiento desmedido en altura y aborto de semillas (Taiz y Zeiger 1998). Más adelante, se descubrió que las giberelinas no eran compuestos que sólo se encontraban en hongos, sino que eran ubicuas del reino vegetal (Hedden y Thomas 2012). Actualmente, se conocen 136 compuestos (aislados a partir de bacterias, hongos y plantas) denominados giberelinas que se nombran por convención con la sigla GA acompañado de un número subíndice, según el orden cronológico en que fueron descubiertas, por ej., GA₁-GA₁₃₆ (MacMillan y Takahashi 1968). Entre las 136 giberelinas sólo GA₁, GA₃ (también llamado ácido giberélico siendo incorrecto ya que todas las giberelinas tienen un grupo carboxilo que les da una naturaleza ácida) y GA₄ poseen actividad biológica *per se* (Kobayashi et al. 1994, Hedden y Thomas 2012). Sin embargo, es muy probable que otras giberelinas 3 β -

hidroxiladas de C19 como GA₇ y GA₃₂ también promuevan el alargamiento caular (Bottini et al. 2004).

1.1.2.1 Estructura de las GAs

Químicamente todas las GAs comparten la estructura del *ent*-giberelano que es un diterpeno (C₂₀) tetracíclico. Asimismo, todas presentan una función carboxilo en el C7 y tienen 19 o 20 átomos de carbono, ya que el C₂₀ puede perderse en la formación del puente lactona entre el C4 y el C10 (Hedden y Thomas 2012). Las giberelinas biológicamente activas presentan las siguientes características estructurales: 1) un grupo hidroxilo en posición C3β, 2) un grupo carboxilo en posición C7 y 3) un puente lactona entre el C19 y C10. Además, la hidroxilación de los carbonos tiene un gran efecto en la actividad biológica de las giberelinas, en general, aquellas que son dihidroxiladas son más activas que las monohidroxiladas (Taiz y Zeiger 1998). Como se puede observar en la Figura 1.4, la diferencia estructural entre las giberelinas biológicamente activas radica en el número de carbonos hidroxilados y en la presencia o no de insaturaciones. De este modo, GA₁ y GA₃ se diferencian de GA₄ por poseer un grupo hidroxilo adicional en el C13, mientras que GA₃ se diferencia de GA₁ por presentar un doble enlace en posición C1-C2.

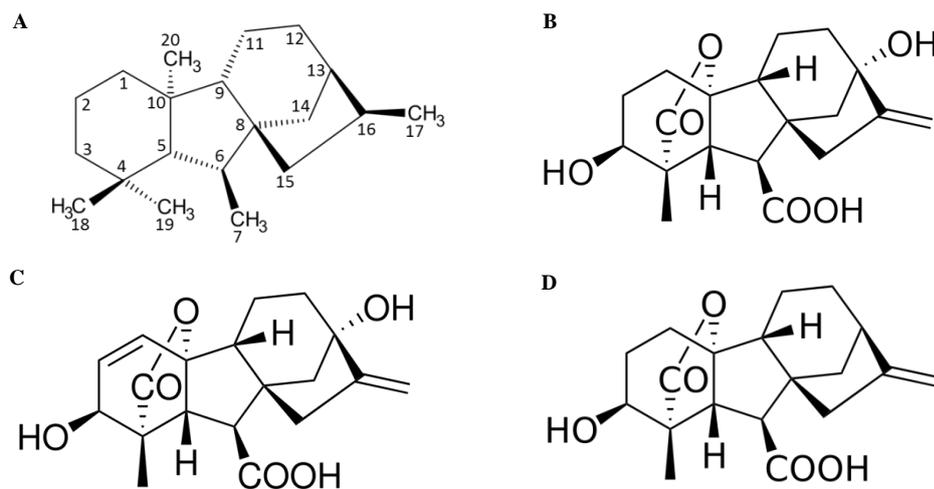


Figura 1.4. Estructura de las giberelinas. (A), *ent*-giberelano; (B), GA₁, (C), GA₃ y (D), GA₄.

1.1.2.2 Efectos fisiológicos de las GAs

La principal función fisiológica que cumplen las GAs es el crecimiento de órganos dado por una estimulación de la expansión y, en algunos casos, división celular (Taiz y Zeiger 1998). La expansión es un proceso que es coordinado rigurosamente e involucra la regulación y la orientación de los microtúbulos, la relajación de la pared celular, la biosíntesis y el ordenamiento de los polímeros constituyentes de la pared, como así también el transporte e incorporación de nuevos componentes de la estructura de la pared (Cosgrove 1997). Además, a medida que el órgano va creciendo aumenta la demanda por azúcares solubles lo que es favorecido por las GAs ya que sobreexpresan los genes que codifican tanto para invertasas como para α -amilasas (Bethke et al. 1997,

Tymowska-Lalanne y Kreis 1998). Asimismo, también se ha observado que estimula a la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS), que es la responsable de la formación de sacarosa en los tejidos vegetales (Cheikh et al. 1992).

Por otro lado, también están involucradas en el desarrollo de las plantas ya que son fundamentales para la finalización del período juvenil y en el inicio del desarrollo reproductivo. En algunas especies las GAs promueven el inicio de la floración mientras que en otras lo inhiben. Además, están involucradas en la finalización de la dormición y comienzo de la germinación. Asimismo, cumplen una importante función en la fertilidad de las plantas, ya que están involucradas en la elongación de los estambres, y son necesarias para la maduración, liberación y germinación del polen, como así también del crecimiento del tubo polínico (Taiz y Zeiger 1998, Hedden y Thomas 2012).

1.1.2.3 Metabolismo de las GAs

1.1.2.3.1 Biosíntesis de las GAs

En plantas superiores, las GAs se forman a partir del precursor diterpénico C₂₀ geranylgeranyl difosfato GGPP a través de la vía MEP (metileritritol fosfato, Aach et al. 1997, Kasahara et al. 2002). La biosíntesis ocurre en tres sitios de la célula, plastidios, retículo endoplasmático rugoso (RER) y citosol. Además, requiere de la intervención de tres clases de enzimas: 1) terpeno sintasas TPS (localizadas en plastidios), 2) citocromos P450 monooxigenasas P450s (en RER) y 3) dioxigenasas solubles dependientes de 2-oxoglutarato ODDs (en citosol, Hedden y Thomas 2012).

La síntesis comienza en plastidios cuando el precursor GGPP es transformado a *ent*-kaureno mediante una reacción en la que participan las enzimas *ent*-copalil difosfato sintasa CPS y la *ent*-kaureno sintasa KS. En primer lugar, la CPS cataliza la reacción de ciclación del GGPP a *ent*-copalil difosfato, y en una segunda reacción la enzima KS cicla al *ent*-copalil difosfato para obtener como producto al *ent*-kaureno (MacMillan y Beale 1999).

En una segunda etapa, el *ent*-kaureno es transformado a GA₁₂ y/o GA₅₃ en el RER mediante participación de las enzimas P450s que catalizan reacciones de oxidación. En este momento, el *ent*-kaureno es transformado a ácido *ent*-kaurenoico mediante una reacción de tres etapas catalizada por la enzima *ent*-kaureno oxidasa KO. La KO se encuentra en la membrana de plastidios y oxida repetidamente el C₁₉ del *ent*-kaureno para obtener *ent*-kaurenol, *ent*-kaurenal y finalmente el ácido *ent*-kaurenoico. A partir de allí el ácido *ent*-kaurenoico es oxidado sucesivamente en el RER mediante la actividad de las enzimas *ent*-kaurenoico oxidasas KAO (Hedden y Phillips 2000, Helliwell et al. 2001, Morrone et al. 2010, Hedden y Thomas 2012). El C₇ del ácido *ent*-kaurenoico se oxida a alcohol formando el ácido *ent*-7 α -hidroxikaurenoico, para luego formar el compuesto GA₁₂ aldehído, finalizando con la formación del ácido carboxílico obteniendo la giberelina GA₁₂ (Hedden 1997, Hedden y Thomas 2012). Una vez formado este compuesto, puede continuar su oxidación en el citosol o seguir oxidándose en el RER para formar GA₅₃. El mismo se produce por la β -hidroxilación del C₁₃ de la GA₁₂ mediante una reacción catalizada por la enzima GA₁₃ oxidasa (Magome et al. 2010, Hedden y Thomas 2012).

Por último, tanto GA_{12} como GA_{53} son oxidados en el citosol por las enzimas ODDs, dentro de las cuales se encuentran las GA_{20} oxidasas y GA_3 oxidasas (Troncoso et al. 2008). Las primeras catalizan la reacción de hidroxilación del C20 para obtener los compuestos GA_{15} y GA_{44} a partir de GA_{12} y GA_{53} respectivamente. Luego, la oxidación continúa hasta obtener los aldehídos GA_{24} y GA_{19} . En una tercera etapa, se establece el puente γ -lactona entre los carbonos C19 y C10 con la consiguiente pérdida del C20 como CO_2 para dar como productos a los metabolitos GA_9 y GA_{20} (Hedden y Thomas 2012). En este punto, las enzimas GA_3 oxidasas catalizan la reacción de β -hidroxilación del C3 de dichos compuestos para obtener las giberelinas activas GA_4 y GA_1 respectivamente (Spray et al. 1996, Itoh et al. 2001, Appleford et al. 2006). Por otro lado, la GA_3 oxidasa también puede actuar como desaturasa generando una doble ligadura entre los carbonos C2 y C3 de la GA_{20} para formar el intermediario GA_5 . La misma enzima puede seguir oxidando a la GA_5 en posición C3 y desplazar, al mismo tiempo, el doble enlace a la posición C1-C2 para obtener como producto final la giberelina biológicamente activa GA_3 (Albone et al. 1990).

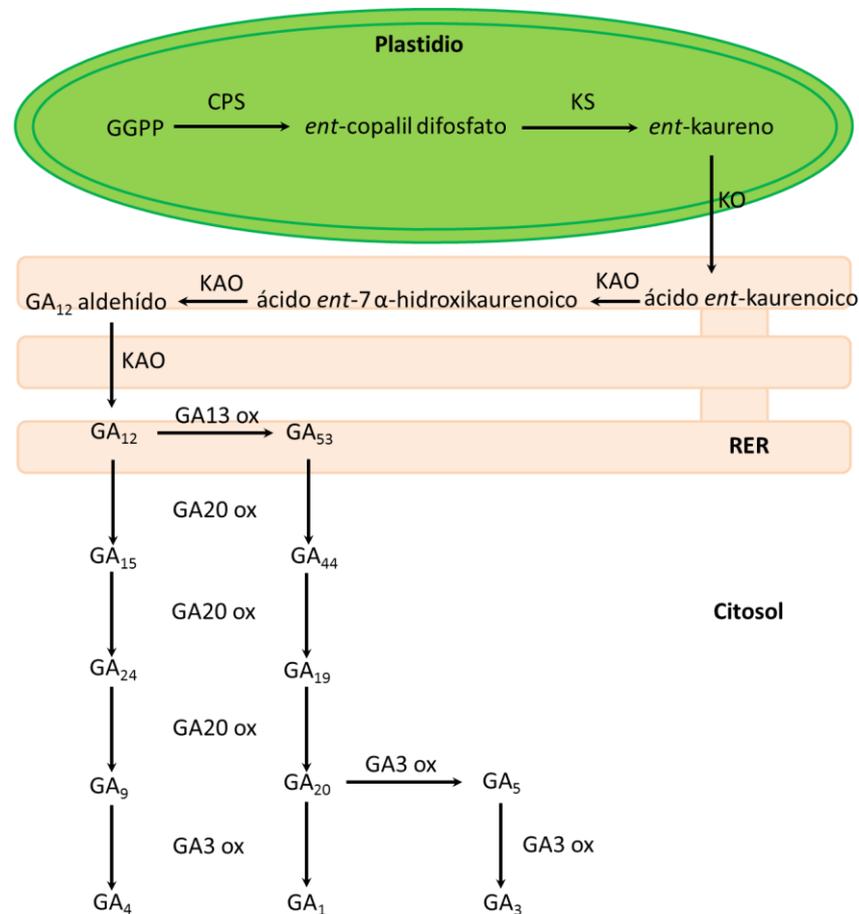


Figura 1.5. Esquema general de la ruta de la biosíntesis de las giberelinas activas GA_1 , GA_3 y GA_4 . GGPP: geranilgeranil difosfato; CPS: *ent*-copalil difosfato sintasa; KS: *ent*-kaureno sintasa; KO: *ent*-kaureno oxidasa; KAO: *ent*-kaurenoico oxidasa; GA13 ox: GA13 oxidasa; GA20 ox: GA20 oxidasa; GA3 ox: GA3 oxidasa; RER: retículo endoplasmático rugoso.

1.1.2.3.2 Catabolismo y conjugación de las GAs

Las plantas superiores son capaces de regular el contenido de GAs en sus tejidos mediante catabolismo irreversible tanto de C20-GAs como de C19-GAs, así como también mediante conjugación reversible de C19-GAs biológicamente activas (Hedden y Thomas 2012). El principal mecanismo de regulación por catabolismo irreversible es llevado a cabo por dos grupos de enzimas ODDs denominadas GA₂ oxidasas que catalizan la reacción de β-hidroxilación en el C2. Asimismo, la enzima tiene la capacidad de continuar oxidando el C2 hasta obtener la cetona correspondiente (catabolito, Hedden y Thomas 2012). El primer grupo de GA₂ oxidasas actúa sobre C20-GAs es decir, utiliza como sustrato a las giberelinas GA₁₂ y GA₅₃ para dar como producto los catabolitos GA₁₁₀ y GA₉₇ respectivamente (Schomburg et al. 2003). El segundo grupo de enzimas actúa sobre C19-GAs, en donde se encuentran tanto los precursores inmediatos como las giberelinas biológicamente activas. Por lo que las enzimas utilizan como sustrato a las giberelinas GA₉, GA₂₀, GA₁ y GA₄ para dar como producto a los catabolitos GA₅₁, GA₂₉, GA₃₄ y GA₈ respectivamente (Thomas et al. 1999). El segundo mecanismo de regulación por catabolismo irreversible es llevado a cabo por un grupo de enzimas pertenecientes a las citocromo P450 monooxigenasas. Las mismas utilizan como sustrato a las giberelinas GA₁₂, GA₉ y GA₄ y catalizan la reacción de formación de 16α-17 epóxidos. La reacción puede continuar espontáneamente hasta formar 16α-17 dihidrodioles. Además, se ha descubierto que este grupo de enzimas es menos activo sobre aquellas giberelinas 13β-hidroxiladas (Zhu et al. 2006, Hedden y Thomas 2012). Finalmente, el tercer mecanismo de regulación es realizado por un grupo de metil transferasas llamadas GAMTA (GA metil transferasas). Sin embargo, se ha encontrado que este tipo de catabolismo se realiza únicamente en semillas, por lo que las enzimas GAMTAs estarían involucradas en el desarrollo de las mismas y en el control de la germinación prematura. Las metil transferasas se encargan de catalizar la reacción de metilación del grupo carboxilo del C6 de las C19-GAs (Brian et al. 1967, Varbanova et al. 2007, Xing et al. 2007).

El segundo mecanismo para regular el contenido de GAs en los tejidos de plantas se lleva a cabo mediante conjugación reversible de GAs activas con un azúcar, dentro de los cuales el más común es la glucosa (Schneider y Schliemann 1994). Hasta la fecha no se han podido aislar y caracterizar a las enzimas responsables de la esterificación de la glucosa con el grupo carboxilo de las giberelinas biológicamente activas. Tampoco se sabe el rol preponderante de las GA-glucosil ésteres, pero se cree que, al igual que en otras hormonas, estarían involucradas en el transporte de GAs a larga distancia como así también de la inactivación de GAs para ser almacenadas (Hedden y Thomas 2012). Además, se ha encontrado que aquellas GAs que presentan hidroxilos en el C2 por acción de las GA₂ oxidasas pueden formar éteres con glucosa. Al parecer, esta unión favorecería la solubilización de dichos catabolitos para ser acumulados en vacuola (Schneider et al. 1992, Jin et al. 2011).

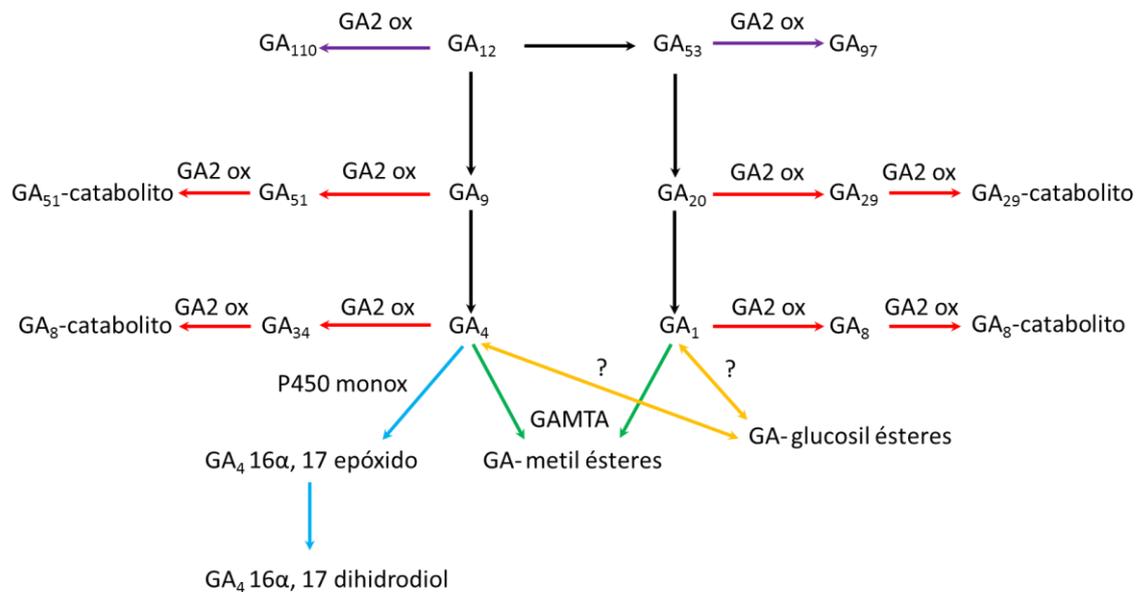


Figura 1.6. Esquema general del catabolismo de las giberelinas. GA2 ox: GA2 oxidasas; P450 monox: P450 monooxigenasa; GAMTA: GA metil transferasa. Las flechas violetas indican las reacciones catalizadas por GA2 ox sobre giberelinas que presentan 20 carbonos; las flechas rojas indican las reacciones catalizadas por GA2 ox sobre giberelinas que presentan 19 carbonos; las flechas verdes indican las reacciones catalizadas por GAMTA; las flechas naranjas indican la formación reversible de GA-glucosil ésteres; las flechas celestes indican la formación de 16 α , 17 dihidrodioles.

1.1.2.4 Señalización de GAs

Al igual de lo que ocurre con la señalización en la mayoría de las hormonas, la molécula señal, en este caso las giberelinas, se encargan de desreprimir el sistema ya formado en las células, en lugar de la creación de nuevos componentes para dar lugar a una respuesta. En este caso, los componentes principales en la transducción de la señal son:

- Receptor de GA: En *Oryza sativa* se ha identificado que el gen *OsGID1* (del inglés GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1) es el encargado de codificar el receptor nuclear de GAs (Ueguchi-Tanaka et al. 2005), mientras que en *Arabidopsis thaliana* se han encontrado tres genes ortólogos (*GID1A*, *GID1B* y *GID1C*) que codifican para el mismo receptor (Nakajima et al. 2006).
- Proteínas represoras (DELLAs): Las DELLAs son proteínas que se encargan de inhibir el crecimiento u otras respuestas dependientes de GAs en ausencia de GAs activas en las células (Peng et al. 1997, Silverstone et al. 1998). Dentro del genoma de *Arabidopsis* se encuentran 5 genes que codifican para DELLAs: GAI (del inglés GA-INSENSITIVE), RGA (del inglés REPRESSOR OF GA), RGAL1, RGAL2 y RGAL3 (del inglés REPRESSOR OF GA-LIKE, Peng et al. 1997, Ikeda et al. 2001, Silverstone et al. 2001, Lee et al. 2002, Wen y Chang 2002, Tyler et al. 2004). Estas proteínas interactúan físicamente con factores de transcripción impidiendo su unión con la región promotora de los genes de respuesta a GAs. Asimismo, se ha descubierto que pueden actuar de forma independiente o de forma conjunta. Por ej., se sabe que la proteína RGL2 es la responsable de inhibir la germinación (Lee et al. 2002), mientras que RGA, RGL1 y RGL2, en forma conjunta, modulan el desarrollo floral en *Arabidopsis* (Cheng et al. 2004, Tyler et al. 2004).

- Enzimas E3 ubiquitin ligasas: Son enzimas que están formando un complejo denominado SCF (del inglés SKP1, CULLIN, F-BOX) E3 ubiquitin ligasas que se encargan de ligar moléculas de ubiquitina a las proteínas DELLA para ser posteriormente reconocidas y degradadas por los proteosomas 26S (Lechner et al. 2006). Uno de los componentes del complejo son las proteínas F-BOX que cumplen con la finalidad de reconocer y unir a las proteínas DELLA con el complejo SCF (Daviere y Achard 2013). *Arabidopsis* presenta dos proteínas F-BOX llamadas SLY1 (del inglés SLEEPY1) y SNZ (del inglés SNEEZY), mientras que en el genoma del arroz sólo se ha encontrado una proteína F-BOX denominada GID2 (del inglés GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2, Jiang y Fu 2007).

Una vez que las GAs activas ingresan a las células son reconocidas por los receptores nucleares GID1. Las GID1 poseen un sitio específico de unión con GAs y una extensión N-terminal que hace las veces de “tapa” para formar el complejo proteico. Ya unidas, ocurre un cambio conformacional del complejo GA-GID1 que favorece la interacción física con las proteínas DELLA (Griffiths et al. 2006, Nakajima et al. 2006, Willige et al. 2007). Luego, el complejo GA-GID1-DELLA es reconocido por el complejo SCF^{SLY1/GID2} E3 ubiquitin ligasa a través de las proteínas F-BOX para ser ubiquitinizado. De este modo, el complejo DELLA-poliubiquitina es reconocido por el proteosoma 26S y posteriormente degradado (Figura 1.7, Lee et al. 2002, McGinnis et al. 2003, Sasaki et al. 2003, Dill et al. 2004, Fu et al. 2004). Una vez degradadas las proteínas DELLA, los factores de transcripción liberados son capaces de promover la transcripción de los genes de respuesta (Figura 1.8). Dentro de éstos podemos encontrar a los que regulan el alargamiento del hypocótilo como los PIFs (del inglés PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS, de Lucas et al. 2008, Feng et al. 2008, Gallego-Bartolomé et al. 2010) y BZR1 (del inglés BRASSINAZOLE RESISTANT1, Bai et al. 2012, Gallego-Bartolomé et al. 2012) y aquellos que controlan la transición floral como SPL (del inglés SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE, Yu et al. 2012). En el Cuadro 1.1 están descritas las proteínas DELLA y los factores de transcripción que participan de algunos procesos fisiológicos mediados por GAs en *Arabidopsis*.

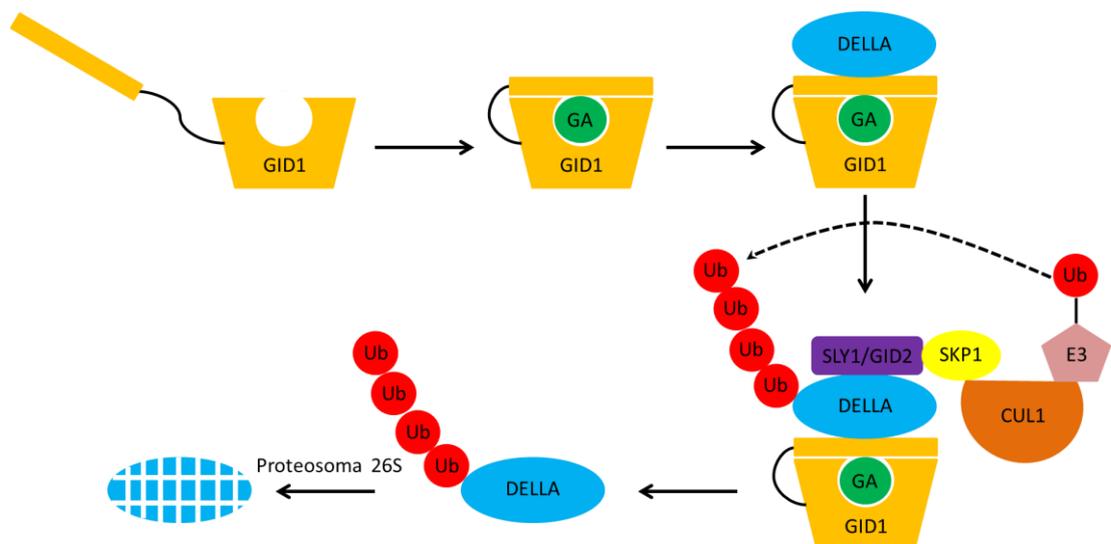


Figura 1.7. Modelo de degradación de las proteínas represoras DELLA, mediada por giberelinas (GA) mediante el proteosoma 26 S. GID1: receptor de GA; Ub: ubiquitina; SLY1/GID2, SKP1, CUL1, E3: complejo E3 ubiquitin ligasa.

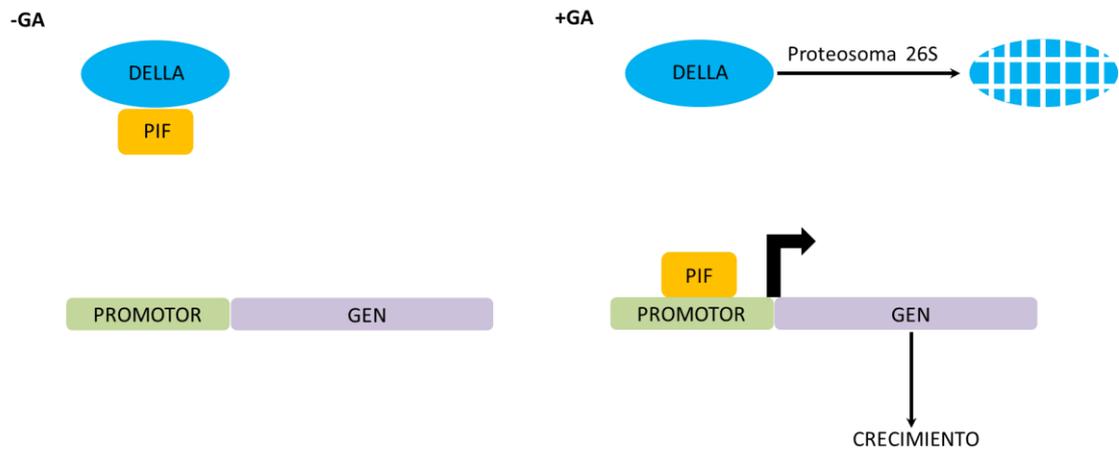


Figura 1.8. Modelo general de señalización por giberelinas. DELLA: proteína represora de giberelinas (GA); PIF: factor de transcripción promotor del crecimiento.

Cuadro 1.1. Proteínas DELLA y los factores de transcripción que participan de algunos procesos fisiológicos mediados por GAs en Arabidopsis.

DELLAs	Factores de transcripción	Función	Referencias
GAI, RGA, RGL1, RGL2, RGL3	PIF1, PIF3, PIF4, PIF6	Elongación del hipocótilo. Biosíntesis de clorofila	De Lucas et al. 2008, Feng et al. 2008, Cheminant et al. 2011, Gallego-Bartolomé et al. 2010.
GAI, RGA, RGL2	ALC	Forma de frutos	Arnaud et al. 2010
RGA, RGL2	SPT	Germinación. Expansión de cotiledones	Gallego-Bartolomé et al. 2010, Josse et al. 2011.
GAI, RGA, RGL1, RGL2, RGL3	MYC2	Biosíntesis de sesquiterpenos	Hong et al. 2012.
GAI, RGA, RGL1, RGL2, RGL3	JAZ1, JAZ3, JAZ4, JAZ8, JAZ9, JAZ10, JAZ11	Elongación de raíz e hipocótilos. Defensa contra patógenos	Hou et al. 2010, Wild et al. 2012, Yang et al. 2012.
GAI, RGA, RGL1, RGL2, RGL3	IDD1	Maduración de semillas. Germinación temprana	Feurtado et al. 2011.
GAI, RGA, RGL1	SCL3	Germinación. Elongación de raíz e hipocótilo	Zhang et al. 2011.
GAI, RGA	EIN3, EIL1, EIL2	Desarrollo del gancho plumular	An et al. 2012.
GAI, RGA, RGL1, RGL3	BZR1, BZR2	Elongación del hipocótilo	Bai et al. 2012, Gallego-Bartolomé et al. 2012.
RGA	SPL9	Transición floral	Yu et al. 2012.

1.2 La vid

Taxonómicamente, la vid se encuentra dentro del orden Vitales y pertenece a la familia Vitaceae. Las Vitáceas comprenden aproximadamente 850 especies correspondientes a 14 géneros y la mayoría son arbustos o lianas leñosas. De acuerdo a la morfología, todas presentan hojas simples o compuestas de disposición alterna, zarcillos opuestos a las

hojas, raíces fibrosas y bien ramificadas y los frutos son bayas con una a cuatro semillas. Además, todos los cultivares de importancia económica que se conocen se encuentran dentro del género *Vitis* L. ($2n=38$ cromosomas) y del subgénero *Muscadinia* L. ($2n=40$ cromosomas, Mullins et al. 1992, Keller 2010).

El género *Vitis* comprende entre 60-70 especies, de las cuales ca. 40 especies son originarias de Europa y Asia y unas 20 especies son originarias de América del Norte (Mullins et al. 1992, Wan et al. 2008 b, c). Las especies Euroasiáticas han dado origen a casi todos los cultivares que se utilizan en la industria vitivinícola. Las especies pertenecientes a este género presentan hojas pubescentes con 5 nervaduras principales, zarcillos compuestos o bifurcados, corteza no adherente y exfoliante, tallos sarmentosos y nudos con diafragma. Además, todas tienen la capacidad de formar raíces adventicias que les permiten propagarse asexualmente mediante estacas (Keller 2010). A pesar de que las especies silvestres son diclino monoicas, es decir, que presentan flores masculinas y femeninas en la misma planta, todas las variedades cultivadas de *Vitis vinifera* presentan flores hermafroditas o muy raramente flores funcionalmente femeninas (Negrul 1938, Pratt 1971). Asimismo, el género *Vitis* se puede dividir en dos grupos: el grupo Americano y el Grupo Euroasiático (Keller 2010).

Dentro del grupo Euroasiático, se encuentra *Vitis vinifera* L., la especie de mayor interés a nivel mundial. Es originaria del oeste de Asia y Europa entre las latitudes 30°-50° N (Mullins et al. 1992, Hardie 2000). A esta especie también se la puede clasificar dentro de la variedad *sativa* o *vinifera* (*Vitis vinifera* var. *vinifera*). La misma tiene la particularidad de ser resistente a suelos pesados y a la sequía. Las plantas pertenecientes a *V. vinifera* var. *vinifera* se caracterizan por ser muy vigorosas, perennes, policárpicas (florece más de una vez durante su vida) y su follaje es caduco (pierde las hojas cada año en invierno). Presentan inflorescencias e infrutescencias en racimos compuestos. Las flores son verdes y pequeñas, presentan 5 sépalos fusionados, 5 pétalos también fusionados que forman la caliptra (cuando florece se desprende desde la base hasta caerse completamente), 5 estambres y un gineceo con dos lóculos que pueden alojar un máximo de 4 semillas. Los frutos son bayas donde se pueden distinguir 3 zonas: el epicarpo (piel u hollejo), el mesocarpo (pulpa) y el endocarpo (donde se encuentran las semillas, Keller 2010).

1.2.1 El Malbec

El cultivar Malbec oriundo de la región de Burdeos (Francia), ha encontrado en Argentina condiciones ecológicas propicias para su desarrollo, principalmente en la provincia de Mendoza, y se ha convertido en el cultivar emblema de la industria nacional del vino (Stajner et al. 2009). Este cultivar muestra particularidades debidas a las diferencias de clima y suelo, características genéticas de las plantas, manejo del viñedo y métodos de elaboración. Según datos del INV desde el año 1993 a la fecha la superficie implantada con esta variedad en el país ha crecido un 240 % y ocupa el primer lugar de importancia entre las variedades de alta calidad enológica destinadas a elaborar vino (representa actualmente el 33,9 % a nivel nacional y 36 % en Mendoza, Informe INV 2011/2012). En Argentina se encuentran implantadas 33864 ha con este cultivar, de las cuales el 86 % se encuentran distribuidas en Mendoza (29281 ha). El varietal Malbec argentino permite lograr vinos de excelente calidad que son apreciados y reconocidos por los consumidores tanto a nivel nacional como internacional. En el año 2012 ocupó el primer lugar en cuanto al volumen de vinos exportados (el 43 % de los

vinos exportados fueron Malbec), siendo Estados Unidos el principal destino de exportación y seguido por Canadá y el Reino Unido (Informe variedad Malbec INV 2013).

1.2.2 El cultivo de la vid en Argentina

Desde sus orígenes la viticultura argentina se ha inclinado netamente hacia el cultivo de variedades para vinificar. La historia de la vitivinicultura en Argentina se remonta a la época de la colonización, ya que el cultivo de la vid estaba estrechamente relacionado con las prácticas agrícolas de los colonos españoles. Las primeras estacas de vid llegaron a mediados del siglo XVI a Cuzco (Perú), de allí pasaron a Chile y a partir de 1551 fueron introducidas en la Argentina, propagándose por el centro, oeste y noroeste del país. En las provincias de Mendoza y San Juan se implantaron los primeros viñedos entre 1569 y 1589, donde se vieron favorecidos por óptimas condiciones climáticas y de suelo. Así, la vitivinicultura manifestó un amplio y acelerado desarrollo.

La vid es el cultivo frutícola mundial de mayor importancia económica y, en conjunto con la industria del vino, constituye una importante fuente de ingresos en la provincia de Mendoza. Actualmente, la República Argentina posee una superficie cultivada con vid de 223.034 ha, representando el 2,81 % de la superficie mundial (www.inv.com.ar).

La vitivinicultura es una de las principales actividades económicas que se desarrolla en Mendoza, la cual ha logrado un progreso importante en los últimos años gracias a las innovaciones tecnológicas y el uso de variedades con alto potencial cualitativo. Es la provincia vitivinícola más importante de Argentina y cuenta con 156570 ha de viñedos, representando el 70 % del total de la superficie de cultivo en el país (223034 ha). Tiene 1200 bodegas, una producción anual de 19,12 millones de qq de uva y 11,46 millones de HL de vino, lo que representa el 75 % de la producción total nacional (15,39 millones de HL), según el Instituto Nacional de Vitivinicultura (www.inv.com.ar).

1.2.3 Metabolismo de la vid

1.2.3.1 Desarrollo de la baya

El crecimiento de la baya se caracteriza por seguir una curva doble sigmoidea, en donde se pueden distinguir tres fases durante las cuales ocurren profundos cambios bioquímicos que determinan la composición de aquella (Kanellis y Roubelakis-Angelakis 1993, Coombe y McCarthy 2000). Durante la fase I ocurre una rápida división celular y posterior aumento del volumen como consecuencia de la acumulación de solutos, entre los cuales se destacan los ácidos tartárico y málico (Possner y Kliever 1985). Durante la fase II o “fase lag”, no se observan cambios de peso o volumen de las bayas y los procesos bioquímicos que ocurren no son del todo claros; sin embargo se sabe que durante el final de esta fase comienza la acumulación de azúcares, coincidente con el comienzo de la maduración de la baya o envero. Durante el final de la fase II, la mayor parte de los azúcares importados a la baya desde las hojas son metabolizados. Envero indica el comienzo de la fase III, que se detecta fácilmente en cultivares de vino tinto por el cambio de color debido al aumento del contenido de antocianos. Además,

esta fase se caracteriza por una disminución de los ácidos orgánicos (principalmente málico) y por un aumento marcado en el contenido de azúcares, que se acumulan principalmente en las vacuolas (Boss y Davies 2001, Conde et al. 2006). Si bien la sacarosa es el principal azúcar transportado en vid (Swanson y El-Shishiny 1958), glucosa y fructosa constituyen los principales carbohidratos de la baya en todas las etapas del desarrollo (Kliewer 1965).

1.2.3.2 Metabolismo y transporte de fotoasimilados

Las bayas, como "órganos de demanda," utilizan para su crecimiento carbohidratos producidos durante la fotosíntesis, y por lo tanto, la acumulación de materia seca es dependiente del CO₂ fijado durante ese proceso.

Tanto en la hojas como en la fase I del desarrollo de la baya, hay aumentos en las proteínas relacionadas con la fotosíntesis: RuBisCo, RuBisCo activasa, ATPasas, glutamina sintetasa (GS), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasas (GAPDHs, Basha et al. 2009). Sin embargo, durante la maduración de la baya se ha demostrado una disminución en la actividad de RuBisCo, como así también baja acumulación de proteínas relacionadas al fotosistema II (PSII, Di Carli et al. 2010). En concordancia con esto, los niveles de transcriptos de numerosos genes relacionados con la fotosíntesis son significativamente altos durante la fase I del desarrollo de la baya, disminuyendo su expresión durante la última etapa de maduración (Terrier et al. 2005, Waters et al. 2005); a excepción de GS y GAPDHs que se mantienen durante todo el proceso de maduración (Negri et al. 2008).

El carbono fijado durante la fotosíntesis es utilizado tanto en la síntesis de almidón como de azúcares. El almidón se acumula temporalmente en cloroplasto, siendo la sacarosa la forma de transporte a distancia donde se almacena como tal, se transforma nuevamente en almidón o en hidratos de carbono estructurales (Taiz y Zeiger 1998).

En vid, los carbohidratos producidos en la fotosíntesis son exportados de la hoja como sacarosa y transportados por floema al racimo (Swanson y El-Shishiny 1958, Conde et al. 2007). Diferentes enzimas participan en la síntesis de sacarosa, tales como sacarosa sintasa (SS) y sacarosa fosfato sintasa (SPS), la cual es desactivada por una quinasa y activada mediante desfosforilación catalizada por una SPS-fosfatasa. La enzima SS cataliza tanto síntesis como degradación de sacarosa, aunque su mayor concentración en tejidos que la degradan sugiere una función principalmente catabólica (Echeverría y Humphreys 1985). En estudios realizados en plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon, se encontró que la expresión de un gen que codifica para SS aumentó gradualmente a lo largo del desarrollo de las bayas, coincidente con una mayor acumulación de hexosas en el órgano (Deluc et al. 2007). La participación de distintos transportadores de hexosas y triosas fosfato identificados en vid varía durante las distintas etapas de desarrollo de la baya (Fillion et al. 1999, Deluc et al. 2007). Mediante análisis *in silico* del genoma completo de vid PN40024 (*Vitis vinifera*, genotipo altamente homocigota), se han determinado 16 genes putativos que codifican para transportadores de hexosas (Johnson et al. 2006, Büttner 2007), de los cuales sólo 5 fueron caracterizados funcionalmente: *VvHT1*, *VvHT2*, *VvHT3*, *VvHT4* y *VvHT5* (Hayes et al. 2007). Además, se han identificado en este genotipo 3 genes putativos que codifican para transportadores de sacarosa: *VvSUC11*, *VvSUC12* y *VvSUC27* (Davies et al. 1999, Ageorges et al. 2000, Manning et al. 2001), 2 genes que codifican para invertasas de membrana vacuolar: *VvGIN1* y *VvGIN2* (Davies y Robinson 1996) y un gen que codifica para una invertasa

de pared celular *VvcwINV* (Hayes et al. 2007). Mediante el uso de microarreglos y PCR en tiempo real se detectaron cambios en los niveles de *VvHTs*, *VvcwINV*, *VvGINs* y *VvSUCs* durante el desarrollo de la baya de la vid (Davies y Robinson 1996, Ageorges et al. 2000, Zhang et al. 2006, Deluc et al. 2007, Hayes et al. 2007). En este sentido, en el cv. Cabernet Sauvignon se encontró que en la fase I aumentan los niveles de expresión de los genes *VvHT1* y *VvHT3* para luego disminuir durante la “fase lag”, a excepción de *VvHT3* que incrementa nuevamente su expresión durante el período de almacenamiento de azúcares (fase III). Mientras que no se observaron variaciones en los niveles de transcritos de *VvHT2* y *VvHT4* a lo largo del desarrollo de la baya, la expresión de *VvHT5* aumentó durante la Fase III (Hayes et al. 2007, Afoufa-Bastien et al. 2010). Por otro lado, los genes *VvSUC11* y *VvSUC12* se expresaron principalmente después de envero, mientras que la expresión de *VvSUC27* está asociada a estadios tempranos del desarrollo de la baya (Davies et al. 1999). Estudios previos de nuestro grupo con el cv. Malbec (Moreno et al. 2011) sugieren la participación de transportadores de hexosas durante envero, tal como sería el codificado por el gen *VvHT6* que responde a estrés abiótico como radiación UV-B (Pontin et al. 2010). Sin embargo, otros investigadores no han encontrado correlación de los genes *VvHTs* con proteínas análogas de transporte (Giribaldi et al. 2007, 2010, Negri et al. 2008, Basha et al. 2009).

Durante pre-envero, en la baya la sacarosa es desdoblada principalmente por invertasas (GIN) de membrana vacuolar (Waters et al. 2005, Zhang et al. 2006, Giribaldi et al. 2007), mientras que a partir de envero las invertasas responsables de la catálisis son de pared celular (*VvcwINV*, Hayes et al. 2007). En bayas del cv. Barbera, mediante análisis de electroforesis en gel de dos dimensiones (2-D) acoplado a LC-ESI-MS/MS se identificaron dos invertasas vacuolares (GIN1,2) que disminuyen drásticamente después de envero, así como una invertasa de pared celular, IRV1, que se mantiene inalterable. Ambas enzimas catalizan la degradación irreversible de la sacarosa dando como productos glucosa y fructosa. Estas observaciones se corresponden con un cambio en la descarga floemática, que durante la fase I y II del crecimiento de la baya es simplástica (mediada por plasmodesmos) para luego ser apoplástica (mediada por transportadores) a partir de envero (Boss y Davies 2001). De esta forma las células acompañantes de los elementos cribosos del floema descargan sacarosa al apoplasto, que es desdoblada a glucosa y fructosa por la acción de invertasas de pared. Los monosacáridos obtenidos, para poder ser almacenados, deben atravesar tanto la membrana citoplasmática como la vacuolar (tonoplasto) mediante los transportadores citados anteriormente.

1.2.3.3 ABA y la partición de fotoasimilados

Numerosos estudios han demostrado que la partición de asimilados es un proceso regulado hormonalmente y que las plantas tienen la “habilidad” de re-direccionar los recursos en respuesta a cambios ambientales y del desarrollo (Ho 1988, Wardlaw 1990, Geiger y Servaites 1991). El ABA aumenta el transporte de asimilados en el floema de órganos que son destinos económicamente importantes, como granos de cereales (Travaglia et al. 2007) y frutas (Lü et al. 1999, Opaskornkul et al. 1999), estimula la captación de nutrientes orgánicos (Guldan y Brun 1987, Yamaki y Asakura 1991), y regula el metabolismo de asimilados (Brady 1987, Wayne y John 1996), aunque los mecanismos de acción aún no se conocen. En plantas de vid se ha visto que los niveles de ABA en bayas disminuyen luego de anthesis, para incrementarse posteriormente en envero (Coombe 1992). Ese incremento se correlacionó con un aumento en los niveles

de transcriptos de una 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa involucrada en la biosíntesis de ABA (Deluc et al. 2007). Asimismo, Wheeler et al. (2009) observaron que el transcripto que codifica para dicha enzima incrementaba con la aplicación de ABA en bayas del cv. Cabernet Sauvignon. Por lo que postularon que el ABA sería uno de los principales responsables de desencadenar la maduración en frutos no climatéricos dado por su posible efecto autocatalítico como ocurre con el etileno en frutos climatéricos. Hayes et al. (2010) observaron la existencia de dominios ABRE y SURE en la región promotora de los genes *VvHT1-5* y *VvcwINV* que actúan como reguladores positivos en *cis* por acción de ABA y azúcares, respectivamente. Además, se ha visto que aplicaciones de ABA a plantas de vid a campo acelera drásticamente la maduración de las bayas, observándose un mayor contenido de azúcares y antocianos sobre todo en el estadio fenológico de envero (Wheeler et al. 2009). Asimismo, estudios de nuestro grupo de trabajo demostraron que las aplicaciones de ABA incrementan el contenido de antocianos en hollejo a cosecha, como así también el tamaño de las bayas (Berli et al. 2008, Quiroga et al. 2009). Por otro lado, estudios con plantas de maíz demostraron que al aplicar ABA se incrementa el área de floema y xilema, favoreciendo así el transporte de fotoasimilados, agua y nutrientes hacia órganos económicamente importantes de la planta (Travaglia et al. 2012).

1.2.3.4 GAs y la partición de fotoasimilados

Las GAs regulan numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos durante el crecimiento y desarrollo de la planta (Davies 2009). En estudios previos de nuestro equipo de trabajo, Bastián et al. (1999) y Bastián (2000) observaron que GA_3 promovió acumulación de carbohidratos y disminución de almidón, estimulando quizás α -amilasas tal como lo hace en aleurona de semillas en germinación (Woodger et al. 2004). Es posible que las GAs faciliten el transporte y acumulación de fotoasimilados favoreciendo la descarga desde la fuente (Daie 1987), ya que se ha demostrado que la fotosíntesis puede ser inhibida por acumulación de productos (Sawada et al. 2001). En uvas de mesa, la aplicación de GAs se ha utilizado para aumentar biomasa y contenido de azúcares (Fidan et al. 1981, Nakamura y Hori 1985). Se ha visto que aumenta el tamaño y fijación de los racimos, descompactación de los mismos y eliminación de semillas (Pires y Bothelo 2002). Asimismo, con aplicaciones después de la floración se ha observado en varios cultivares un incremento en el número, peso y tamaño de las bayas (Pires et al. 1986, Kalil et al. 1999). Por otro lado, genera pérdida en la firmeza del hollejo, reducción en el número de semillas y aumento en el crecimiento del tallo. Se ha visto también que aplicaciones de GA_3 en vid, producen un mayor grosor y endurecimiento por lignificación de pedicelos, asociado a una mayor acumulación de sacarosa y aumento en el número de células xilemáticas (Fidan et al. 1981, Nakamura y Hori 1985). Además, aplicaciones con giberelina A_3 (GA_3) genera varios efectos indeseables como aumento del vigor de las plantas con la consecuente reducción en la fertilidad de las yemas, desgranado del racimo en poscosecha y una mayor susceptibilidad de los frutos a la podredumbre (Razeto y Espinoza 1990, Retamales et al. 1995). A pesar de haber sido ampliamente estudiado en cultivares de uva de mesa, la aplicación de GA_3 sobre variedades viníferas ha sido poco probado y sus efectos son aún menos conocidos. En estudios recientes de nuestro grupo de trabajo con vid cv. Malbec, se ha visto que ABA y GAs regulan en forma diferencial la partición de carbono, incrementando la acumulación de azúcares en bayas (Moreno et al. 2011).

Objetivos e hipótesis

1.3 Objetivo general

Estudiar el efecto regulador de ABA y GA₃ sobre la anatomía de los haces vasculares, el metabolismo secundario y la expresión de genes involucrados en el metabolismo, transporte y almacenaje de carbohidratos en plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.

1.3.1 Objetivos específicos

- I. Estudiar el efecto regulador de ABA y GA₃ sobre el crecimiento, fijación de CO₂ y partición de fotoasimilados en plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.
- II. Estudiar el efecto regulador de ABA y GA₃ sobre la anatomía de haces vasculares de hojas, tallos y pedicelos de bayas y la conductividad hidráulica del tallo en plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.
- III. Estudiar el efecto regulador de ABA y GA₃ sobre el perfil de carbohidratos y ácidos orgánicos en hojas y bayas de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.
- IV. Estudiar el efecto regulador de ABA y GA₃ sobre la expresión de genes que codifican para transportadores de hexosas y sacarosa e invertasas vacuolares y de pared celular en hojas y bayas de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.
- V. Estudiar el efecto regulador de ABA y GA₃ sobre el perfil de aminoácidos, terpenos, antocianos y polifenoles de bajo peso molecular en plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.

1.4 Hipótesis de trabajo

- I. GA₃ promueve la partición de fotoasimilados hacia las bayas incrementando la fijación de CO₂ por una estimulación del crecimiento vegetativo de las plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec; mientras que ABA promueve la partición de fotoasimilados hacia las bayas sin modificar la fijación de CO₂ ni el crecimiento vegetativo de las plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.
- II. ABA y GA₃ incrementan el área de floema y xilema de los tejidos vasculares de hojas, tallos y pedicelos de bayas que se traducen en un aumento de la conductividad hidráulica del tallo y en un aumento en la acumulación de glucosa y fructosa en las bayas de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.
- III. ABA y GA₃ modulan de forma diferencial el perfil de carbohidratos y ácidos orgánicos en hojas y bayas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.
- IV. ABA y GA₃ sobre expresan los genes que codifican para transportadores de azúcares e invertasas tanto en hojas como en bayas de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.
- V. ABA y GA₃ modulan de forma diferencial el perfil de terpenos, aminoácidos, antocianos y polifenoles de bajo peso molecular en hojas, bayas y raíces de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.

Capítulo 2: Efecto regulador de ABA y GA₃ sobre parámetros de crecimiento, parámetros fisiológicos y la partición de fotoasimilados en plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.

2.1 Introducción

La partición de fotoasimilados es el proceso mediante el cual el carbono es distribuido desde las hojas fotosintéticamente activas hacia el resto de los órganos y tejidos heterotróficos de la planta. Es un proceso que regula fuertemente el crecimiento y desarrollo de las plantas, como así también el rendimiento a cosecha (Genard et al. 2008). En la mayoría de las plantas superiores, salvo algunas excepciones, la sacarosa es el principal azúcar transportado (Avigad 1982, Kühn et al. 1999, Zapata et al. 2004), mientras que el almidón es el polisacárido de reserva (Zapata et al. 2004). Asimismo, los distintos órganos y tejidos heterotróficos compiten por los fotoasimilados y, por lo tanto, su distribución determina si la planta favorece el crecimiento vegetativo, el desarrollo reproductivo o la acumulación de almidón.

Según lo explicado anteriormente, la fotosíntesis es el primer proceso metabólico a considerar en la partición de fotoasimilados. Durante la misma, el CO₂ y el fosfato inorgánico son convertidos en triosas fosfatos, que luego son metabolizadas en sacarosa para ser utilizado en el transporte hacia órganos destinos. Sin embargo, una parte de las triosas fosfato es retenida en el cloroplasto para la síntesis de almidón y desdoblado a sacarosa durante la noche para continuar con el proceso de translocación. La caída de la tasa fotosintética puede ser inducida tanto por limitaciones estomáticas como no estomáticas. En el primer caso, una baja tasa fotosintética puede deberse al cierre parcial de estomas que trae aparejado una disminución de la concentración del CO₂ en la cavidad sub-estomática (Sánchez-Díaz et al. 2004). En el segundo caso, una reducción en la conductancia del mesofilo disminuye la concentración de CO₂ en los cloroplastos de las células del parénquima en empalizada y, por lo tanto, disminuye la actividad de la enzima Rubisco por falta de sustrato (Flexas et al. 2002, 2009). La conductancia del mesofilo es de particular importancia en aquellas especies hipostomáticas, es decir, en aquellas especies cuyos estomas se encuentran únicamente en la cara abaxial de las hojas, como es el caso de la vid. Otros autores sugieren que las limitaciones no estomáticas de la fotosíntesis son atribuibles a una baja eficiencia de carboxilación como así también a una disminución del contenido y/o actividad de la Rubisco (Long et al. 2004). Asimismo, tanto la reducción de la conductancia estomática como la del mesofilo son las principales causas de la caída de la tasa fotosintética en plantas de vid con estrés hídrico (Flexas et al. 2010). Sin embargo, en estudios con yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), aplicaciones con ABA mostraron un cierre parcial de estomas sin que esto afectara la fotosíntesis neta. Esto llevó a la promoción del crecimiento vegetativo por una disminución de la pérdida de agua por transpiración y el consiguiente incremento del potencial de turgencia de las células de las hojas (Sansberro et al. 2004). Por otro lado, la fuerza de los destinos pueden incrementar la actividad fotosintética de las hojas (Bazzaz et al. 1987, Kaitaniemi y Honkanen 1996). En este sentido, Subrahmanyam y Rathore (1992) encontraron que, en plantas de mostaza tratadas con GA₃, la exportación de fotoasimilados desde los órganos fuentes hacia los órganos destinos incrementó significativamente debido a una estimulación de la actividad de los destinos. Además, GA₃ estimula la actividad de α -amilasas (Kinet 1993, Woodger et al. 2004) disminuyendo el contenido de almidón en hojas (Bastián et al. 1999) y, por consiguiente, incrementa la actividad fotosintética al disminuir la inhibición por retroalimentación (Sawada et al. 2001).

La excelencia del vino está directamente relacionada con la calidad de las bayas, por lo que es de suma importancia asegurar una elevada concentración de azúcares en las mismas a cosecha. Además, un buen tenor azucarino no sólo es de importancia para ser usado como sustrato en la obtención de alcohol durante el proceso de vinificación, sino que también los azúcares actúan como esqueletos carbonados para la síntesis de metabolitos secundarios (Hornsey 2007), favoreciendo las características organolépticas del producto final. En este sentido, las fitohormonas podrían ser compuestos claves en la regulación de la síntesis de carbono como así también de su transporte a órganos destinos (Davies 2009, Wheeler et al. 2009).

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Material vegetal y condiciones experimentales

Para llevar a cabo el experimento se hizo crecer en macetas plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) de un año de la variedad Malbec sometidas a condiciones de campo en el Instituto de Biología Agrícola de Mendoza, Luján de Cuyo. Para ello, se forzó a enraizar estacas de 20 cm de longitud extraídas, en el invierno de la temporada anterior, de un viñedo experimental situado en el INTA-Mendoza. Previamente, la base de las estacas fueron sumergidas en una solución de 0,6 μM de ANA (ácido naftalen acético) durante 24 h y se llevaron a cámara de forzadura. Allí, se colocaron en perlita manteniendo la base a 28 °C, a través de un sistema de calefacción por tuberías, mientras que la sección superficial de las estacas fue mantenida a una temperatura de 4 °C. Luego de 5 semanas, se transplantaron los barbechos (estacas enraizadas) a macetas de 10 L conteniendo como sustrato 100 % de orujo agotado. Una vez llegada la primavera, se eligió el mejor brote de cada planta y se lo dejó crecer durante toda la temporada. Asimismo, se ralearon las plantas a un solo racimo para facilitar los experimentos de transporte de carbono. Las mismas se regaron durante todo el ensayo con una frecuencia de 2 días hasta capacidad de campo para evitar estrés hídrico.

Se planteó un diseño experimental totalmente aleatorizado con 3 tratamientos y 8 réplicas por cada momento de desarrollo de la baya (pre-envero, envero y post-envero, 72 plantas en total), tomando como unidad experimental una planta. Los tratamientos consistieron en asperjar la planta entera con soluciones de ABA, GA₃ y agua+Tritón X-100 (control) semanalmente, desde post-cuaje (10 días después de anthesis, DDA) hasta madurez completa de la baya (130 DDA). Las mismas fueron aplicadas con un aspersor manual al atardecer para minimizar la fotodegradación del ABA. La dosis de cada uno de los tratamientos fueron elegidas de acuerdo a experiencias previas de nuestro grupo de trabajo (Quiroga et al. 2009, Berli et al. 2010, Moreno et al. 2011), a saber: 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ABA (\pm -S-*cis*, *trans* ácido abscísico, PROTONE SL, Valent BioSciences, Libertyville, IL, USA), 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ GA₃ (GIBERELINA KA, S. Ando & Cía. SA, Buenos Aires, Argentina) y control (agua+Tritón X-100). En todas las soluciones se agregó 0,05 % de Tritón X-100 como surfactante.

Si bien el experimento fue finalizado en madurez completa de la baya (130 DDA), la mayoría de las mediciones fisiológicas, bioquímicas y anatómicas se realizaron en 100 % envero, donde todas las bayas del racimo han cambiado de color pasando del verde al violeta. Esto se debió a que en este estadio fenológico ocurren los cambios fisiológicos y bioquímicos más sustanciales en la planta. Por otro lado, se observó que las aplicaciones con ABA adelantaban una semana el envero, mientras que las aplicaciones con GA₃ lo retrasaban 5 días con respecto al control. Es decir, que en las plantas tratadas con ABA el cambio de color de las bayas se observó a los 63 DDA, mientras que las tratadas con GA₃ lo hicieron a los 75 DDA, cinco días más tarde que el control (70 DDA). Debido a este fenómeno, las muestras de hojas y bayas se extrajeron cuando cada una de las plantas llegó a envero y no en una fecha arbitraria. Esto ayudó a minimizar interpretaciones erróneas de los resultados, ya que muchos de los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas de vid están fuertemente influenciados por el desarrollo. Sin embargo, las muestras de pre-envero y post-envero se extrajeron la

misma fecha independientemente del tratamiento aplicado, es decir 30 y 130 DDA respectivamente.

2.2.2 Parámetros de crecimiento

El largo del brote, el largo de entrenudos, el número de nudos por planta, el área foliar total y el peso específico de las hojas de la planta fueron medidos a los 62 DDA, es decir, el día previo a la extracción de las muestras de envero del tratamiento con ABA.

2.2.2.1 Largo del brote, largo de entrenudos y número de nudos por planta

Se determinó el largo del brote (cm) de cada una de las plantas utilizando una cinta métrica, contabilizando, al mismo tiempo, el número de nudos por planta. Asimismo, el largo de entrenudos (cm) se estimó dividiendo el largo del brote por el número de nudos de cada planta.

2.2.2.2 Área foliar total

Se extrajeron 10 hojas de 10 plantas que fueron crecidas en las mismas condiciones que las tratadas, eligiendo hojas apicales, medias y basales del brote. Una vez recolectadas las 100 hojas, se las colocó en una bolsa de plástico, previamente rociada con agua para evitar su deshidratación, y se las llevó al laboratorio. Allí, se determinó el largo de la nervadura central, el peso de dos discos de hoja de 1 cm^2 (extraído con sacabocado) y el peso total de cada una de las hojas. Con los valores de pesos de la hoja y de los discos se estimó el área total de cada hoja y, luego, se lo correlacionó con el largo de la nervadura central. Se generó así un modelo cuyo coeficiente de regresión (R^2) fue superior a 0,9. Posteriormente, el modelo se utilizó para transformar los valores de largo de nervadura central, medidos en todas las hojas de cada planta, en valores de área foliar (Figura 2.1). Para determinar el área foliar total de la planta se sumó el área foliar de cada hoja de cada planta.

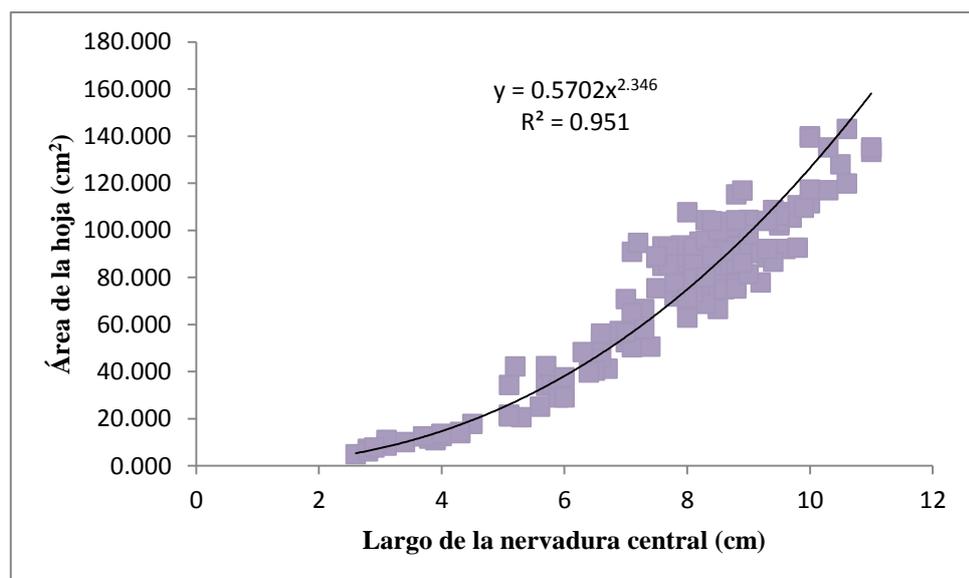


Figura 2.1. Gráfico de correlación entre área foliar y el largo de nervadura. Se muestra el modelo de regresión y el R^2 .

2.2.2.3 Peso específico de las hojas

Para determinar el peso específico de las hojas, dos hojas de la parte media del tallo de cada planta fueron extraídas e inmediatamente colocadas en bolsas de plástico y llevadas al laboratorio. Luego, 4 discos, de la parte media de la hoja, de 1 cm² fueron extraídos de cada una con un sacabocado, teniendo especial cuidado en evitar tomar la nervadura central y secundarias. Los 32 discos (4x8) de cada tratamiento se secaron en estufa a 60 °C hasta peso constante. Finalmente, los valores fueron expresados en g m⁻².

2.2.3 Parámetros fisiológicos

2.2.3.1 Fotosíntesis neta y conductancia estomática

La fotosíntesis neta (P_n , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la conductancia estomática (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) por unidad de área fueron determinadas utilizando un analizador de gases por infrarrojo IRGA CIRAS-2 (PP System, Amesbury, MA, USA) durante una semana, desde los 57 DDA hasta los 62 DDA, coincidente con la semana previa a la extracción de las muestras de envero del tratamiento ABA. Las lecturas se realizaron por la mañana, desde las 9:00 h hasta las 11:00 h sobre hojas completamente expandidas (10^{ma}-12^{va} hoja a partir del ápice). Para estimar la P_n y la g_s por planta, los valores obtenidos por unidad de área se multiplicaron por el área foliar de cada planta, calculada a los 62 DDA, y fueron expresadas como $\mu\text{mol CO}_2 \text{ planta}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $\text{mmol H}_2\text{O planta}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

2.2.3.2 Pigmentos fotosintéticos

El contenido total de clorofilas de la hoja (clorofila *a* y clorofila *b*) fue medido a los 62 DDA, a través de un método no destructivo utilizando un medidor de clorofila a campo (SPAD-502Plus, KONICA MINOLTA, Osaka, Japan). Las mediciones se tomaron en la zona media de la hoja, y entre la nervadura central y el margen de la misma; tomando cinco hojas de la parte media del brote de cada planta. Los valores fueron expresados en unidades SPAD.

2.2.4 Análisis anatómicos

2.2.4.1 Improntas

La densidad estomática fue determinada en envero tomando dos improntas de la cara abaxial de una hoja completamente expandida (13^{ra} hoja) de todas las plantas de cada tratamiento (16 improntas por tratamiento), utilizando esmalte de uñas transparente. Se tomaron sólo de la cara abaxial debido a que la vid es una especie hipoestomática, es decir, que el 100 % de los estomas se encuentran en esa cara de la hoja. Las improntas fueron realizadas en la parte media de cada lado de la nervadura central. Esto es, entre la base y el ápice de la hoja y entre el margen y la nervadura central de la misma. Una vez secas, se extrajeron y se las colocaron sobre un portaobjeto tapándolas con un

cubreobjeto y sellando los bordes también con esmalte para uñas transparente para ser vistas, luego, bajo el microscopio óptico (40X). Se tomaron 3 fotografías representativas por impronta con una cámara AxioCam HRc anexada al microscopio óptico Zeiss Axiphot (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Por lo tanto, la densidad estomática fue calculada como la media del número de estomas por mm^2 de 6 fotografías por hoja. Para analizar las fotografías se utilizó el programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics Inc, Rockville, MD, USA).

2.2.5 Partición de fotoasimilados

Cuando cada una de las plantas de cada tratamiento llegó a envero, 4 plantas de las 8 réplicas por tratamiento fueron separadas en hojas, tallo, raíz y bayas; dejando a las restantes 4 seguir creciendo para los análisis de post-envero. A cada una de las partes se las colocó en bandejas de aluminio y se las llevó a estufa a 60 °C hasta peso constante para determinar el peso seco (PS, g) de cada una de las partes. Luego, se determinó el PS total de la planta sumando el PS de cada una de las partes, mientras que la partición de fotoasimilados se estimó mediante el porcentaje de PS de hojas, tallo, raíz y bayas con respecto al PS total.

2.2.6 Análisis de datos

Para analizar estadísticamente los datos se realizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y posterior prueba de comparación de medias utilizando el estadígrafo LSD de Fisher. Se fijó un nivel de significancia de $p < 0,05$ para diferenciar entre medias utilizando el programa InfoStat (<http://sites.google.com/site/fgstatistics>).

2.3 Resultados

2.3.1 Efecto de ABA y GA₃ sobre la fenología y los parámetros de crecimiento

Como se explicó anteriormente, el tratamiento con ABA adelantó el inicio de la maduración de las bayas en 7 días (63 DDA), mientras que las aplicaciones con GA₃ la retrasaron 5 días (75 DDA) con respecto al control (70 DDA).

Se observó que las aplicaciones con ABA no modificaron el área foliar total, el largo del brote, el largo de entrenudos ni el peso específico de las hojas con respecto al tratamiento control (Cuadro 2.1). Por otro lado, las aplicaciones con GA₃ produjeron un crecimiento exacerbado de la parte aérea, en donde se observó un incremento significativo del área foliar total y del largo del brote, pero una disminución significativa del peso específico de las hojas con respecto a los restantes tratamientos (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Parámetros de crecimiento de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec medidos a los 62 DAA. Los valores corresponden a medias \pm EE, n=8. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). LB: largo del brote; LE: Largo del entrenudo; AFT: área foliar total; PEH: peso específico de hojas.

Tratamiento	LB (cm)	LE (cm)	N° de nudos	AFT (cm ² 10 ³)	PEH (g m ⁻²)
Control	156.40 \pm 8.91 <i>b</i>	4.15 \pm 0.22 <i>b</i>	37.75 \pm 0.77 <i>a</i>	2.33 \pm 0.11 <i>b</i>	71.01 \pm 3.56 <i>a</i>
ABA	164.28 \pm 11.37 <i>b</i>	4.25 \pm 0.21 <i>b</i>	37.71 \pm 1.04 <i>a</i>	2.37 \pm 0.12 <i>b</i>	68.33 \pm 2.19 <i>a</i>
GA ₃	199.11 \pm 3.25 <i>a</i>	5.06 \pm 0.08 <i>a</i>	37.71 \pm 1.04 <i>a</i>	3.06 \pm 0.09 <i>a</i>	49.69 \pm 3.83 <i>b</i>

2.3.2 Efecto de ABA y GA₃ sobre los parámetros fisiológicos y la densidad estomática

Las aplicaciones con ABA produjeron una caída en la conductancia estomática (g_s) y por lo tanto en la fijación neta de CO₂ por unidad de área durante los primeros tres y dos días post-aplicación, respectivamente, con respecto al control. Luego, los valores fueron en aumento hasta alcanzar a aquellos del tratamiento control (Figura 2.2 A y B). El mismo patrón fue observado cuando los valores de Pn y g_s fueron expresados por unidad de planta entera (Figura 2.2 C y D). Asimismo, no hubo diferencias significativas en el contenido de clorofilas totales ni en la densidad estomática entre el tratamiento con ABA y el tratamiento control (Figura 2.3 y Figura 2.4). Por otro lado, las aplicaciones con GA₃ provocaron una disminución significativa tanto en la fotosíntesis neta como en la conductancia estomática cuando éstas se expresaron por unidad de área (Figura 2.2 A y B). Mientras que, cuando fueron expresadas por unidad de planta entera, no se observaron diferencias entre GA₃ y el control (Figura 2.2 C y D). Además, la densidad estomática y el contenido de clorofilas totales disminuyeron por la aplicación de GA₃ (Figura 2.3 y Figura 2.4).

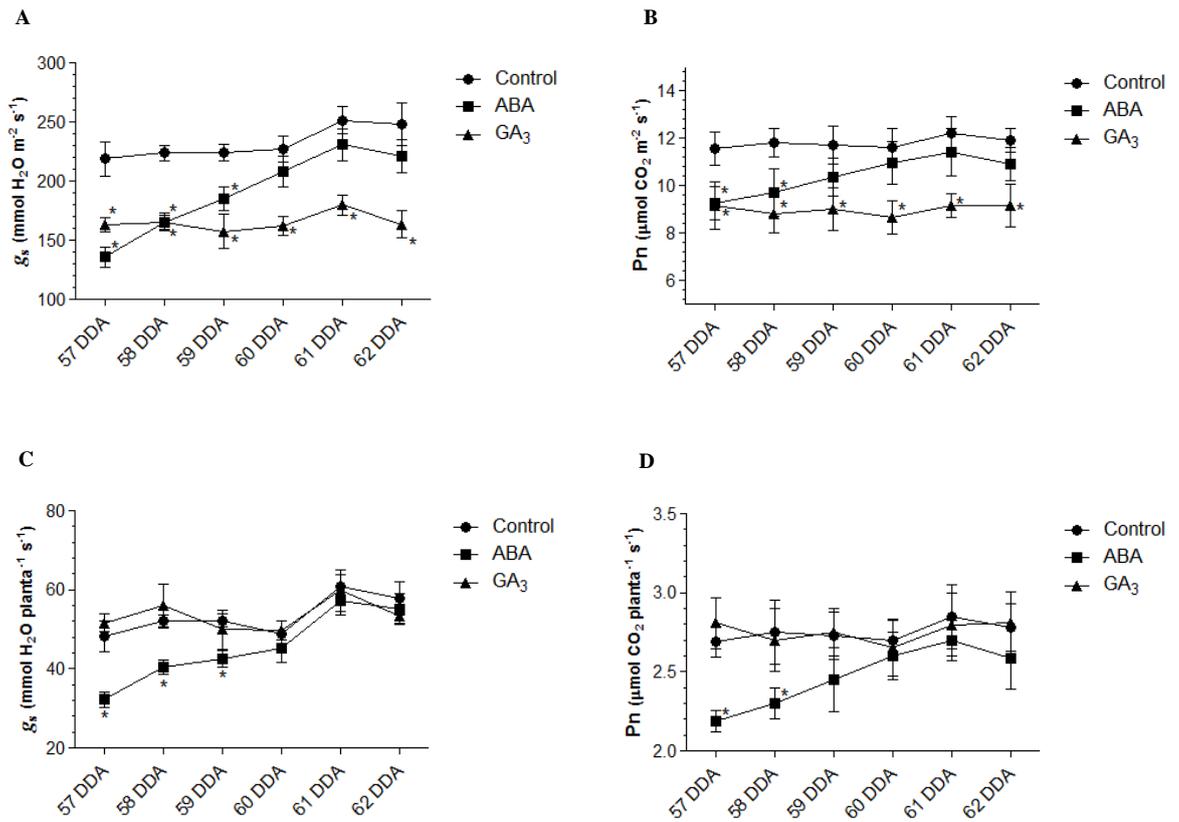


Figura 2.2. Efecto de ABA y GA_3 sobre la fotosíntesis y conductancia estomática en *Vitis vinifera* L. cv. Malbec. (A), conductancia estomática expresada por unidad de área (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (B), fotosíntesis neta expresada por unidad de área (Pn, $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (C), conductancia estomática expresada por unidad de planta entera (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O planta}^{-1} \text{s}^{-1}$); (D), fotosíntesis neta expresada por unidad de planta entera (Pn, $\mu\text{mol CO}_2 \text{planta}^{-1} \text{s}^{-1}$) medidas desde los 57 hasta los 62 DDA (días después de anthesis). Los valores corresponden a las medias \pm EE, n=8. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada momento de cada tratamiento ($p < 0,05$).

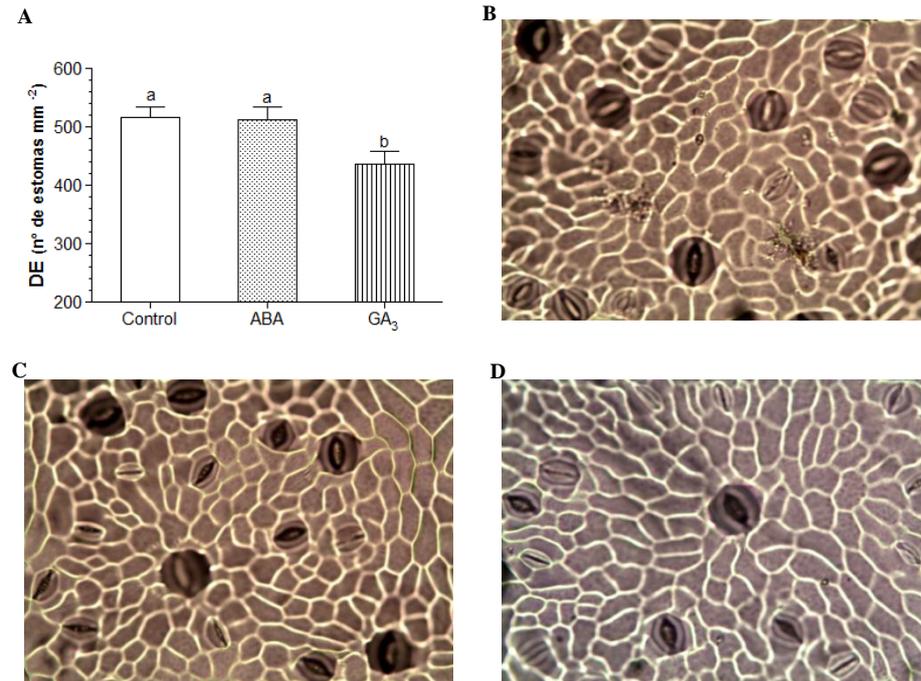


Figura 2.3. Efecto de ABA y GA₃ sobre la densidad estomática en *Vitis vinifera* L. cv Malbec. (A), densidad estomática (DE, n° de estomas mm⁻²) en hojas de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=16. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). Fotografías de impresiones; (B), control; (C), ABA; (D), GA₃.

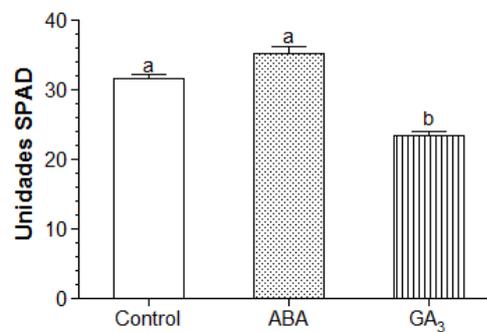


Figura 2.4. Pigmentos fotosintéticos (Unidades SPAD) en hojas de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec medidos a los 62 DDA. Los valores corresponden a medias \pm EE, n=8. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

2.3.3 Efecto de ABA y GA₃ sobre la partición de fotoasimilados

Si bien las aplicaciones con GA₃ produjeron un crecimiento exacerbado de la parte aérea de las plantas, el peso seco (PS) total de las mismas no se modificó con respecto al control (Figura 2.5 A). Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre el PS total de las plantas tratadas con ABA y las plantas control en enero (Figura 2.5 A). Sin embargo, según la proporción de PS de cada uno de los órganos en estudio en enero (Figura 2.5 B), se observó que hubo un mayor transporte de carbono hacia las

bayas tratadas con ABA (18,29 %) que con respecto al control (12,37 %) en detrimento de las hojas (29,89 % en relación al 33,38 % del control) y tallo (40,08 % en relación al 43,28 % del control). Por otro lado, el mayor transporte de carbono en las plantas tratadas con GA₃ fue destinado al tallo (65,59 %) en comparación con el control (43,28 %) en detrimento de los restantes órganos de la planta. Por ejemplo, el porcentaje de PS de la raíz (5,38 %), de las hojas (20,36 %) y de las bayas (8,67 %) fueron significativamente inferiores que los porcentajes de PS de raíz (10,97 %), hojas (33,38 %) y de bayas (12,37 %) de las plantas control (Figura 2.5 B).

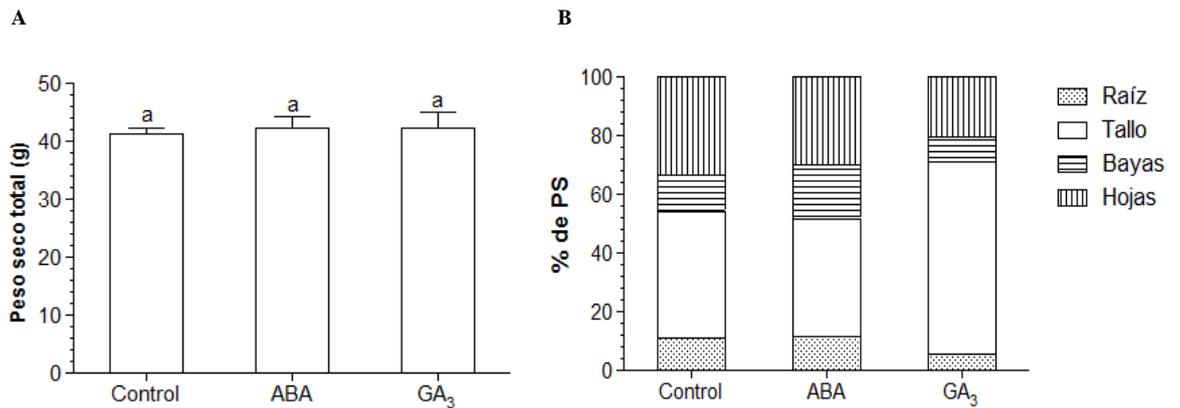


Figura 2.5. Efecto de ABA y GA₃ sobre el peso seco total y la distribución de fotoasimilados en *Vitis vinifera* L. cv. Malbec. (A), peso seco total (g) y (B), distribución del peso seco (% de PS) en las diferentes partes de la planta de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

2.4 Discusión

Como en la mayoría de los frutos, la acumulación de azúcares en las bayas de vid no sólo depende de la cantidad de carbono fijado durante la fotosíntesis sino que también es dependiente de la fuerza con que ese destino “atrae” los fotoasimilados producidos en la hoja. En el presente trabajo, se observó que el tratamiento con ABA modificó la fenología de las bayas adelantando el envero unos 7 días (63 DDA) con respecto al control (70 DDA), confirmando el rol promotor del ABA en el transporte de carbono desde las hojas (fuente) hacia los frutos (destinos, Yang y Zhang 2006, Travaglia et al. 2007, Travaglia et al. 2009, Moreno et al. 2011), y por lo tanto en la regulación de la maduración (Wheeler et al. 2009). En contraposición, las aplicaciones con GA₃ retrasaron la maduración de los frutos unos 5 días (75 DDA) con respecto al control.

Como fue de esperarse, las aplicaciones con GA₃ incrementaron tanto el largo del tallo como así también el área foliar total. El mayor largo del tallo fue debido exclusivamente al crecimiento de los entrenudos más que a una mayor cantidad de entrenudos. Por otro lado, la mayor expansión foliar trajo como resultado hojas más delgadas, en coincidencia con el menor peso específico de las mismas. Asimismo, el incremento en el área foliar total no trajo aparejado un aumento de Pn, como se pensó en su momento, debido al bajo contenido de clorofilas y de estomas por unidad de área como se discutirá más adelante.

Las aplicaciones con ABA mostraron una disminución momentánea de la Pn tanto por unidad de área como por unidad de planta entera, la cual fue atribuible al cierre parcial de estomas. Asimismo, los valores, al cabo de dos días, igualaron a los del control posiblemente a una regulación homeostática de la planta para controlar el contenido endógeno de ABA. Esto pudo haber sido mediante una disminución de la biosíntesis, a través de inactivación por glicosilación o, como fue demostrado por Kushiro et al. (2004), mediante catabolismo vía ABA-8'-hidroxilasa. Por otro lado, las aplicaciones con GA₃ mostraron una disminución significativa tanto de Pn como de g_s cuando se expresaron por unidad de área, mientras que los valores de estas dos variables fueron semejantes a las del control cuando fueron expresadas por unidad de planta entera. Además, las plantas tratadas con GA₃ mostraron una disminución en el contenido de los pigmentos fotosintéticos totales como así también de la densidad estomática. Teniendo en cuenta lo anterior, se postula que tanto la caída en la tasa de fijación de carbono como de la conductancia estomática fue debida a un efecto de dilución, dado al incremento del área foliar total, más que por algún efecto regulador de GA₃.

Los valores de PS de las plantas no variaron entre los distintos tratamientos en concordancia con los valores de fijación neta de carbono de cada uno de los tratamientos. La partición de fotoasimilados hacia los distintos órganos de la planta fue estimada a partir del porcentaje de PS de cada uno de los órganos. En este sentido se encontró que ABA promovió el transporte de carbono desde las hojas hacia los frutos en coincidencia con el adelantamiento del inicio de la maduración de los frutos. Asimismo, es probable que ABA aumente la fuerza de las bayas como órgano destino a través de distintos mecanismos, los cuales serán tratados en los siguientes capítulos de la presente tesis. Por otro lado, GA₃ priorizó el transporte de carbono desde las hojas hacia el tallo. Por esta razón, las plantas tratadas con GA₃ retrasaron el comienzo de la maduración de los frutos, ya que, al fotosintetizar lo mismo que las plantas control, el carbono disponible fue utilizado como elemento constituyente de las paredes celulares de fibras

xilemáticas y de elementos del vaso; en lugar de ser acumulado en las vacuolas de las bayas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos de éste capítulo, en ésta sección, se puede aceptar parcialmente la hipótesis de trabajo I. Es decir, el ABA sí promueve el transporte de carbono hacia las bayas del cv. Malbec sin afectar la fotosíntesis neta ni el crecimiento general de las plantas. Por otro lado, GA₃ no promueve la localización de carbono en las bayas ni tampoco estimula la fijación neta de CO₂, pero sí estimula el crecimiento vegetativo de las plantas del cv. Malbec.

Capítulo 3: Efecto regulador de ABA y GA3 sobre la anatomía vascular, la conductividad hidráulica del tallo y el perfil de carbohidratos no estructurales y ácidos orgánicos en plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.

3.1 Introducción

La vid, en relación a la industria vitivinícola, es uno de los cultivos de mayor importancia económica a nivel mundial. La excelencia de los vinos está directamente relacionada con la calidad de los frutos, por lo tanto, la acumulación de azúcares y la síntesis de metabolitos secundarios juegan un papel fundamental. En la vid, los carbohidratos producidos en las hojas son exportados hacia las bayas a través del floema en forma de sacarosa (Conde et al. 2007). Este disacárido migra desde las células parenquimáticas del mesofilo hacia el complejo célula acompañante-elemento del tubo criboso de las nervaduras de la hoja vía plasmodesmos, mediante un proceso denominado carga floemática (Sauer 2007, Turgeon y Wolf 2009, Dinant y Lemoine 2010). Asimismo, según la frecuencia de plasmodesmos que conectan a las células del mesofilo con las células del floema, se han dividido a las especies en tres grupos: el grupo 1 que presentan una alta frecuencia de conexiones plasmodésmicas, el grupo 2 que presentan las menores frecuencias y el grupo 1-2a que presentan frecuencias intermedias (Gamalei 1989, 1991). Además, se ha postulado que aquellas especies pertenecientes al grupo 1 realizan la carga floemática de forma pasiva, es decir, vía plasmodesmos siguiendo un gradiente de concentración; mientras que las especies del grupo 2 lo harían mediante carga activa, vía transportadores de azúcares. Sumado a lo anterior, se ha visto que aquellas especies pertenecientes al grupo 1 corresponden a familias de plantas leñosas y arbustos, como es el caso de la vid, mientras que aquellas del grupo 2 pertenecen a plantas herbáceas (Gamalei 1989, 1991, van Bel y Gamalei 1992, Slewinski et al. 2013). Por lo expuesto anteriormente, en vid es importante conocer la variación en los contenidos de sacarosa y de otros carbohidratos no estructurales para estimar la carga floemática en las nervaduras de las hojas.

A lo largo del desarrollo de las bayas, estas sufren cambios bioquímicos que las llevan a acumular grandes cantidades de hexosas como así también metabolitos secundarios que están directamente relacionados con las características organolépticas de los frutos y posteriormente de los vinos. De este modo, a partir del establecimiento de los frutos o “cuaje”, la sacarosa que llega desde las hojas es utilizada para el crecimiento de la baya por división celular y al mismo tiempo se metaboliza para formar y acumular ácidos orgánicos, dentro de los cuales, los más importantes son el ácido málico y el ácido tartárico (Coombe 1992, Possner y Kliewer 1985). De acuerdo con Kliewer (1966), los ácidos málico y tartárico representan del 69-92 % de los ácidos orgánicos en hojas y bayas de vid. La acumulación de los mismos en bayas continúa hasta llegar a un pico en enero para después disminuir al ser catabolizados por respiración o ser metabolizados en azúcares. El ácido que sufre el mayor catabolismo es el ácido málico, por lo que el ácido tartárico es el responsable de la acidez de los vinos, factor muy importante en la calidad de los mismos (Conde et al. 2007). La biosíntesis del ácido tartárico en las bayas comienza con el ácido L-ascórbico. Un paso clave en la formación del ácido tartárico es el clivaje de un intermediario de 6 carbonos en la posición C2/C3 o C4/C5, dependiendo de las especies. La reacción da como productos ácido oxálico y L-treonato, que luego es convertido en ácido tartárico más un compuesto de 2 átomos de carbono como puede ser el glicolaldehído (Loewus 1999). Asimismo, la biosíntesis del ácido tartárico ocurre únicamente desde post-antesis hasta enero (Saito y Kasai 1982, Coombe y McCarthy 2000, de Bolt et al. 2006). Por otro lado, la síntesis del ácido málico se realiza a través de la β -carboxilación del ácido fosfoenolpirúvico mediante la enzima fosfoenolpiruvato

carboxilasa para dar como producto al oxalacetato (Meynhardt 1963, 1965, Ribéreau-Gayon 1968, Hawker 1969), que será reducido a ácido málico mediante la enzima citosólica malato deshidrogenasa (Meynhardt 1965, Hawker 1969). El catabolismo se lleva a cabo mediante tres vías, por un lado, la enzima citosólica NADP-málica cataliza la descarboxilación oxidativa dando como productos el ácido pirúvico y CO₂ (Hawker 1969, Possner et al. 1981, Ruffner et al. 1984). La segunda y tercera vía se realizan en la mitocondria, en este sentido la degradación puede ocurrir a través de la enzima malato deshidrogenasa o la enzima NADP-málica mitocondrial que dan como productos al ácido oxalacético y al ácido pirúvico más CO₂, respectivamente. Se ha encontrado que el balance entre la síntesis y el catabolismo del ácido málico está regulado mediante la temperatura. De este modo, temperaturas de 20-25 °C favorecen la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa, mientras que temperaturas mayores, de hasta 46 °C, incrementan la actividad de las enzimas málicas (Conde et al. 2007). Por lo expuesto anteriormente, las uvas que se producen en regiones frías como las del norte de la Patagonia y zonas altas de Mendoza tendrán mayor acidez que aquellas producidas en zonas cálidas como las del Este de Mendoza y de San Juan.

A partir de enero comienza la acumulación masiva de hexosas como glucosa y fructosa en las vacuolas de las células del mesocarpo de los frutos. Aproximadamente 20 días después de comenzado este estadio fenológico, la concentración de hexosas puede llegar hasta cerca de 1 M, con una relación glucosa/fructosa cercana a 1. Debido a que la sacarosa es el principal azúcar transportado desde las hojas hasta las bayas, la rápida acumulación de hexosas involucra la actividad de invertasas de pared, citosólicas y vacuolares (Fillion et al. 1999, Conde et al. 2007).

El crecimiento radial de los tallos está determinado por el crecimiento y desarrollo de los tejidos vasculares, estimulados por el meristema secundario denominado cámbium. Asimismo, el crecimiento secundario afecta el crecimiento general de las plantas ya que está involucrado directamente en el transporte de agua, nutrientes y fotoasimilados. Es sabido que el crecimiento y desarrollo de las plantas está bajo un estricto control ambiental y hormonal. Por su parte, las hormonas pueden tener un efecto directo o indirecto (crosstalk) en la participación de la estimulación del cámbium o en la diferenciación de las células del floema y xilema. A la fecha, se ha determinado que tanto auxinas, citoquininas, GAs, ABA, etileno como estrigolactonas están involucradas en tales procesos (Sorice et al. 2013), y que las auxinas y citoquininas han sido, por mucho, las más estudiadas en lo que crecimiento secundario se refiere (Tuominen et al. 1997, Aloni 2001, Milioni et al. 2001, Moyle et al. 2002, Bhalerao y Bennet 2003, Carlsbecker y Helariutta 2005, Sieburth y Deyholos 2006, Matsumoto-Kitano et al. 2008, Nieminen et al. 2008). Por otro lado, las GAs han vuelto a ser centro de interés en los últimos años (Björklund et al. 2007, Dayan et al. 2010, Ragni et al. 2011), mientras que el accionar mediado por ABA en el crecimiento y desarrollo de los tejidos vasculares ha sido menos estudiado.

Dayan et al. (2012), trabajando con plantas mutantes de tabaco, observaron que las auxinas estarían involucradas en la diferenciación de los elementos del vaso, mientras que las GAs participarían en la diferenciación y elongación de las fibras xilemáticas. También observaron un efecto sinérgico entre ambos reguladores, en donde la ausencia de uno u otro daba como resultado un desarrollo deficiente del xilema por inhibición de la actividad del cámbium. Del mismo modo, Björklund et al. (2007) sugieren que las GAs actuarían de forma indirecta en el desarrollo de los elementos del vaso, ya que

observaron que estas hormonas estimularon la expresión de los transportadores de auxinas en el cámbium. Si bien se ha estudiado el efecto que producen las GAs en relación a los tejidos vasculares en diferentes especies como tabaco, álamo y lino (Eriksson et al. 2000, McKenzie y Deyholos 2011, Ragni et al. 2011, Dayan et al. 2012), por el momento poco se sabe de sus efectos en vid.

En relación al ABA, hay cierta controversia en lo que respecta a su participación en la diferenciación y crecimiento del xilema y floema. Por un lado, se ha encontrado que el ABA inhibe el crecimiento secundario al ralentizar la actividad del cámbium (Jenkins y Sheperd 1974, Dumbroff et al. 1979, Little y Wareing 1981). Asimismo, Popko et al. (2010) postularon que el ABA inhibiría la actividad del meristema secundario por interferir en la vía de señalización de auxinas. Además, es sabido que el ABA regula negativamente la expresión de genes involucrados en la hidrólisis de los polisacáridos de pared, afectando de este modo su extensibilidad y por lo tanto el crecimiento celular (Gimeno-Gilles et al. 2009). Sin embargo, hay evidencia de que el ABA promueve el crecimiento y desarrollo de las células del xilema y floema (Rancic et al. 2007, Travaglia et al. 2012), pero los mecanismos por los cuales ocurre aún son desconocidos.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Material vegetal y condiciones experimentales

Tanto las plantas de vid como las condiciones experimentales utilizadas en este capítulo se corresponden con las del capítulo 2.

3.2.2 Análisis anatómicos

De las 4 plantas por tratamiento utilizadas para el ensayo de partición de fotoasimilados en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃), se extrajeron secciones de pedicelos de la zona central del raquis, discos de hojas de 1 cm² de la 12^{va} hoja a partir del ápice y secciones de tallo ubicadas al nivel de inserción del racimo. Las secciones de pedicelos y los discos de hojas se colocaron inmediatamente en tubos eppendorf de 1,5 mL conteniendo solución FAA, etanol: ácido acético glaciado: formaldehído: H₂O destilada (50:5:10:35, v/v); mientras que las secciones de tallos se guardaron en tubos Falcon de 15 mL conteniendo la misma solución, hasta el momento del procesamiento de las muestras. Los materiales fueron procesados según protocolo desarrollado por Travaglia et al. (2012). Brevemente, las muestras contenidas en FAA se deshidrataron en una serie de mezclas de alcohol etílico-xilol, se incluyeron en Histowax (parafina de alta pureza con agregado de cera y polímeros) y se cortaron secciones transversales, de hojas y pedicelos, con un micrótopo rotativo de 10 a 13 μm de espesor. Posteriormente las secciones fueron coloreadas con la triple coloración de Hematoxilina-Safranina y Fast Green y se montaron utilizando DPX. En el caso de los tallos, se realizaron cortes a mano alzada que fueron clarificados en hipoclorito de sodio al 30 % hasta que se observaron blancos, se lavaron varias veces con agua destilada y luego se colorearon con safranina acuosa al 1 %. Para la observación y posterior análisis, se tomaron fotografías mediante una cámara AxioCam HRC anexada al microscopio óptico Zeiss Axiohot (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Las fotografías se tomaron en cada una de las muestras y se analizaron mediante el programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics Inc, Rockville, MD, USA).

3.2.3 Contenido de azúcares solubles y ácidos orgánicos

La determinación de la concentración de azúcares solubles (glucosa, fructosa, sacarosa e inositol) y de ácidos orgánicos (ácido málico, ácido tartárico y ácido cítrico) fue realizada mediante cromatografía de gases acoplada a detección por ionización de llama (GC-FID), de acuerdo a Bartolozzi et al. (1997). Las muestras de hojas y de bayas fueron tomadas de 4 plantas por tratamiento en los tres momentos fenológicos: pre-envero (30 DDA), envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y pos-envero (130 DDA). Las hojas se extrajeron de la sección media del brote, para asegurarse de que fueran adultas, completamente expandidas y que transportaran activamente sacarosa. En el caso de las bayas, se homogenizaron 10 bayas desaminadas con N₂ líquido con pilón y mortero. Del tejido molido, se tomó 2 g y se le adicionó 20 mL de una solución 0,05 M de imidazol en etanol (pH 7,0, 1:1, v/v), al cual se le agregó 10 mg de di-β-fenilglucopiranososa (de una solución al 2,5 % disuelta en etanol al 10 %) como estándar

interno. La mezcla se agitó durante 18-24 h, en tubos Falcon de 50 mL, a temperatura ambiente y posteriormente los tubos fueron centrifugados a 8000 rpm durante 10 min, trasvasando el sobrenadante a otro tubo Falcon de 50 mL. El pellet fue re-extraído con 20 mL de la misma solución de imidazol utilizada en la primera extracción. Nuevamente se agitó la mezcla durante 18-24 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se le adicionó al anterior y finalmente se extrajeron 2 mL del extracto para ser evaporado hasta sequedad en un vial de 1.5 mL bajo flujo de N₂. En el caso de las hojas, se molió 1 g de tejido liofilizado y se extrajo con imidazol en etanol siguiendo el mismo protocolo que en bayas, variando las cantidades de solvente y estándar interno. En este sentido, se hizo una doble extracción con 20 mL de imidazol agregando 2,5 mg de estándar interno y secando 4 mL del extracto en vial de 1,5 mL. Los extractos fueron tratados con 500 µL de piridina, 250 µL de hexametilsilazano y 50 µL de trimetilclorosilano y fueron calentados a 50 °C durante 1 h. Los trimetilsilil derivados se inyectaron en un cromatógrafo de gases (Varian CP 3800), equipado con un inyector tipo Split y un detector de ionización de llama. Se utilizó una columna HP-1 J &W Scientific de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 mm de espesor de película. La temperatura tanto del inyector como del detector fue regulada a 350 °C. El programa de temperaturas del horno fue de 140 °C durante 1 min, luego de 140 °C a 230 °C a razón de 6 °C por min, luego de 230 °C a 270 °C a razón de 8 °C por min, posteriormente de 270 °C a 330 °C a razón de 12 °C por min, luego de 330 °C a 350 °C a razón de 20 °C por min y finalmente se mantuvo la temperatura a 350 °C durante 6 min. La determinación cualitativa de cada uno de los azúcares y ácidos orgánicos se realizó mediante comparación de los tiempos de retención de los estándares correspondientes. La cuantificación de cada uno de los compuestos se realizó comparando el área bajo la curva del estándar di-β-fenilglucopiranososa de concentración conocida, con el área bajo la curva de cada uno de los compuestos de concentración desconocida. Los resultados fueron expresados en mg baya⁻¹ y en µg cm⁻² en bayas y hojas, respectivamente.

3.2.4 Determinación de almidón

Para la determinación de almidón se tomaron 2 discos de hoja de 1 cm² por hoja de cada una de las 4 plantas por tratamiento. Las mismas se extrajeron de hojas adultas, de la sección media del brote en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Las muestras fueron homogenizadas en mortero con 800 µL de etanol 80 % en agua, se trasvasaron a tubos eppendorf de 1,5 mL y se agitaron suavemente. Luego, los tubos fueron colocados en baño termostático a 70 °C durante 90 min. Posteriormente, se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se secó en estufa durante 24 h a 35 °C. Luego, se agregó 1,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se dejó a 60 °C durante 45 min en agitación. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min a 12000 rpm. El sobrenadante se hizo reaccionar con reactivo de lugol (una solución acuosa de yoduro de K 10 % e yodo metálico 5 %) y se midió en espectrofotómetro como se describe a continuación. Se tomó 150 µL del sobrenadante, se agregó 3 mL de H₂O y 150 µL de reactivo de lugol y se midió la DO a 610 nm. El blanco contenía 150 µL de DMSO en lugar de la muestra. La concentración de almidón de cada muestra se calculó a partir de una curva de concentración conocida con un modelo de regresión para transformar los valores de DO de las muestras. El coeficiente de correlación (R²) fue superior a 0,9 (Figura 3.1). Los valores fueron expresados en µg cm⁻².

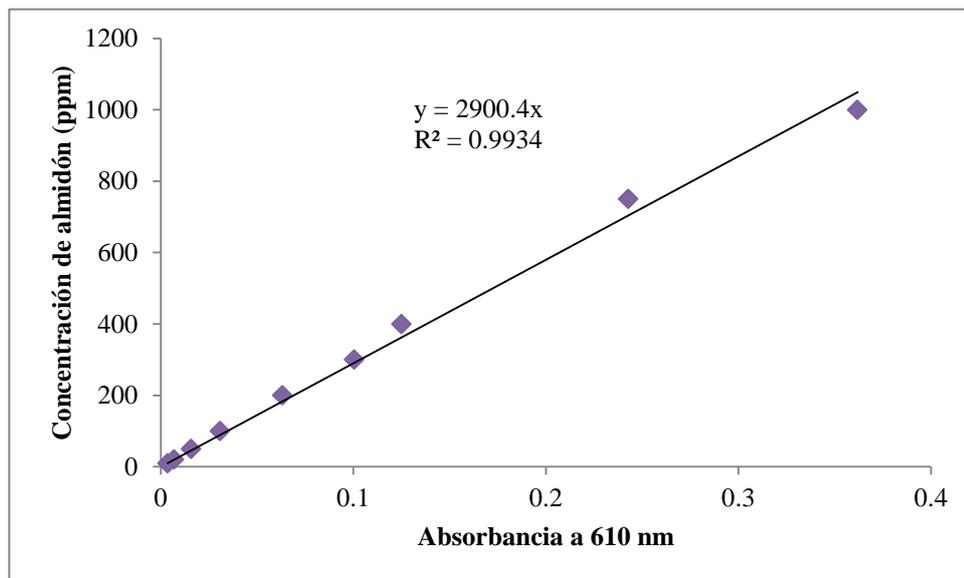


Figura 3.1. Recta de correlación entre concentración de almidón (ppm) y la absorbancia a 610 nm. Se muestra el modelo de regresión y el R^2 .

3.2.5 Determinación de la actividad amilasa

Muestras de 500 mg de hoja extraídas de hojas adultas de 4 réplicas biológicas por tratamiento en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA_3) fueron homogenizadas mediante mortero y pilón con 3 mL de buffer (150 mM Tris-HCl pH 8,9, 3 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM ácido ascórbico, 10 mM $MgCl_2$ y 10 %, v/v glycerol). Luego, se trasvasó la mezcla a un tubo Falcon de 15 mL y se agregó polivinilpolipirrolidona (PVPP, 1 %, p/v); los tubos se centrifugaron a 9000 rpm durante 20 min. Todos los pasos realizados hasta el momento se hicieron a 0-4 °C. Se recolectó el sobrenadante y se lo colocó en tubos eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente se determinó el contenido de proteínas totales a 595 nm de acuerdo al protocolo de Bradford (1976) con suero de albúmina bovina (BSA) como estándar. Para ello, a 2,9 mL del buffer (100 ppm Comassie Blue, 10 %, v/v H_3PO_4 85 % y 5 %, v/v etanol absoluto) se le adicionó 100 μ L de la muestra, se agitó suavemente y se leyó la absorbancia a 595 nm en cubetas de 1 cm. La concentración de proteínas totales (μ g) se calculó a partir de una curva de concentración conocida, utilizando BSA (1μ g μ L⁻¹), con un modelo de regresión para transformar los valores de absorbancia de las muestras; siendo el coeficiente de correlación (R^2) superior a 0,9 (Figura 3.2).

La actividad amilasa fue evaluada de acuerdo a Hagenimana et al. (1994) con modificaciones. Se tomaron 50 μ L del sobrenadante obtenido anteriormente y se lo colocó en un tubo Falcon de 15 mL conteniendo 450 μ L del buffer citrato (100 mM de buffer citrato de sodio pH 5,6). Al mismo tiempo, en otro tubo, se colocó 50 μ L del sobrenadante de la misma muestra + 450 μ L del buffer citrato + 1 mL de NaOH 0,4 M, para utilizarlo como control endógeno. Por otro lado, el blanco se realizó colocando 500 μ L del buffer citrato + 1 mL de NaOH 0,4 M en un tercer tubo Falcon de 15 mL. Los tubos se incubaron en baño maría a 40 °C durante 5 min. Transcurrido el tiempo, se adicionó a cada tubo 500 μ L de una solución de almidón (1 %, p/v) y se incubaron nuevamente en baño maría a 40 °C durante 5 min. Posteriormente, se enfriaron en hielo

e inmediatamente se agregó, al tubo conteniendo la muestra problema, 1 mL de NaOH 0,4 M. En cada tubo se adicionó 2 mL del reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para que reaccione con los azúcares reductores, de acuerdo al protocolo descrito por Miller (1959), y se llevaron a baño maría a 100 °C durante 10 min. Luego, los tubos se enfriaron en hielo y se agregó 10 mL de H₂O mΩ. Se midió la absorbancia a 540 nm y el contenido de azúcares reductores producidos durante la reacción se calculó a partir de una curva de concentración conocida (utilizando maltosa como estándar) con un modelo de regresión para transformar los valores de absorbancia de las muestras. El coeficiente de correlación (R^2) fue superior a 0,9 (Figura 3.3). La actividad amilasa fue definida como la cantidad de maltosa producida por mg de proteínas totales y por min. El contenido de maltosa producido en la reacción se calculó restando la concentración de maltosa obtenida en cada una de las muestras problema a la concentración de maltosa presente en sus correspondientes controles endógenos. La razón de hacer este cálculo es que el reactivo DNS reacciona con todos los azúcares reductores presentes en la muestra y por lo tanto, de no hacerlo, los resultados serían erróneos por la presencia de azúcares reductores como glucosa y fructosa que no se han generado producto de la actividad de las enzimas amilasas.

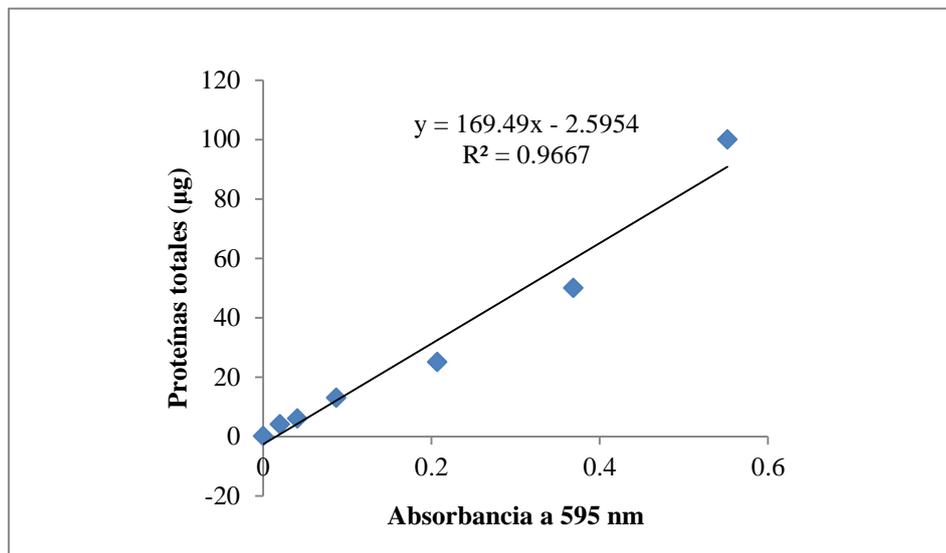


Figura 3.2. Recta de correlación entre concentración de proteínas totales (µg) y la absorbancia a 595 nm. Se muestra el modelo de regresión y el R^2 .

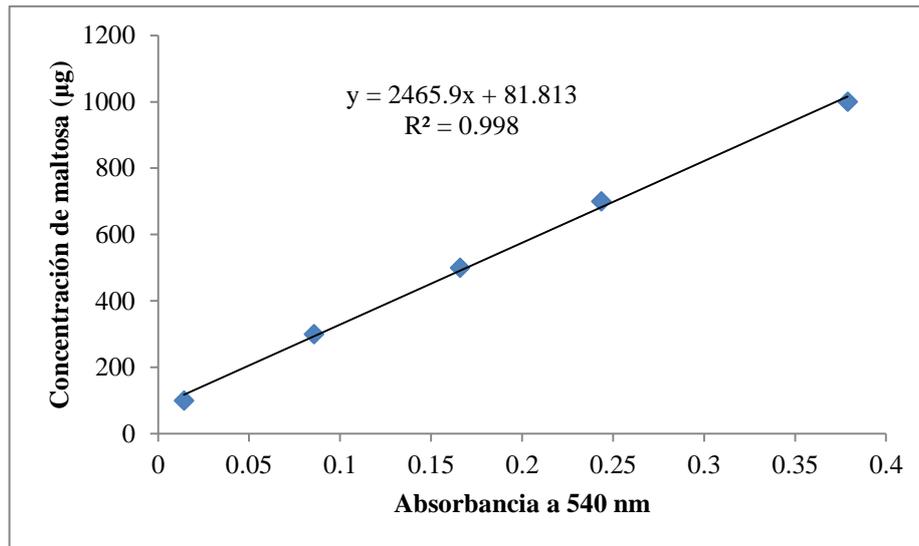


Figura 3.3. Recta de correlación entre concentración de maltosa (μg) y la absorbancia a 540 nm. Se muestra el modelo de regresión y el R^2 .

3.2.6 Ensayos de conductividad hidráulica

Previo a la determinación de PS en las 4 réplicas biológicas por tratamiento en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA_3), se determinó la conductividad hidráulica máxima (k_{max}) de los tallos. La k_{max} se define como la mayor o menor facilidad con la que el xilema deja pasar el H_2O a través de él, por unidad de área transversal a la dirección del flujo, habiendo removido todos los embolismos del tallo. Para esto, se extrajeron todas las hojas, dejando una porción de 1 cm de peciolo, y el racimo, también dejando una porción de 1 cm de pedúnculo, de cada uno de los tallos. Una vez hecho esto, se sellaron todas las heridas con un impermeabilizante comercial. Luego, se cortó el tallo desde la base de su inserción en la estaca y se lo colocó en un recipiente con agua. Bajo el agua, se cortó y descartó una sección de 5 cm a partir de la base del tallo; de esta manera se evitó el ingreso de aire y, por consiguiente, la formación de embolismos. Al ser la vid una especie que presenta vasos xilemáticos largos, aproximadamente de 50-90 cm de longitud según Choat et al. (2010), para la determinación de la k_{max} se utilizaron tallos con una longitud de 1 m para asegurarse, por lo menos, la presencia de un vaso xilemático completo. El extremo basal del tallo se lo unió al extremo de la manguera del conductímetro, también bajo el agua, mientras que el otro extremo del conductímetro estaba conectado a la fuente de agua, que la proveía a una presión constante. Ya conectado, se dejó pasar el agua a través del tallo durante 10 min para asegurarse de que se removieran todos los embolismos que pudiera haber en él y, a su vez, llegar a un flujo constante de salida. Pasado los 10 min, se recolectó, en un tubo Falcon de 15 mL, la cantidad de agua expulsada del extremo distal del tallo durante 1 min, mientras que al mismo tiempo se registró la resistencia al paso del agua anotando la presión que indicaba el manómetro del conductímetro. Transcurrido el min, se pesó el H_2O que se recolectó. Por último, se midió el diámetro, sin corteza, del extremo basal y distal del tallo junto con el diámetro de sus respectivas médulas, usando un calibre, para calcular el área (círculo u óvalo) efectiva promedio que tenía que atravesar el H_2O . Habiendo

tomado todos los datos, se calculó la k_{max} mediante la siguiente fórmula:

$$k_{max} = \frac{\left\{ \left(\frac{\text{Peso del agua, Kg}}{\text{T tiempo, s}} \right) \times \text{Long tallo, m} \right\}}{(\text{Área, m}^2 \times \text{Presión, MPa})} \cdot \text{Los resultados fueron expresados en Kg m}^{-1} \text{ MPa}^{-1} \text{ s}^{-1}.$$

3.2.7 Determinación del potencial agua pre-amanecer

El potencial agua de las plantas ($\Psi_{w_{planta}}$) fue medido en la 14^{ta} hoja a partir del ápice de las 8 réplicas biológicas por tratamiento a los 62 DDA, utilizando la cámara de presión de Schoelander (BIO-CONTROL, Industrias del Sur SA, Argentina). Las mediciones fueron realizadas en pre-amanecer desde las 3:30 am hasta las 5:00 am, para garantizar el equilibrio de agua en el continuo suelo-planta y evitar las pérdidas de agua por apertura estomática. Los resultados fueron expresados en MPa.

3.2.8 Análisis de datos

Para analizar estadísticamente los datos se realizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y posterior prueba de comparación de medias utilizando el estadígrafo LSD de Fisher. Se fijó un nivel de significancia de $p < 0,05$ para diferenciar entre medias utilizando el programa InfoStat (<http://sites.google.com/site/fgstatistics>).

3.3 Resultados

3.3.1 ABA y GA₃ modifican el área de los tejidos vasculares

ABA y GA₃ incrementaron el área del floema de la nervadura central de las hojas como así también del pedicelo de las bayas en comparación con el tratamiento control (Cuadro 3.1 y Figuras 3.4 A-F). Además, los tallos de las plantas tratadas con ABA mostraron los mayores valores de área de floema en comparación con los restantes tratamientos (Cuadro 3.1 y Figuras 3.4 G-I). ABA y GA₃ incrementaron significativamente el área del xilema en nervaduras centrales de hojas, pedicelos de bayas y en tallos, presentando las plantas tratadas con GA₃ los valores más altos. Asimismo, el área del elemento de los vasos xilemáticos se vio incrementado en el tratamiento ABA, mientras que se observó una disminución significativa en el tratamiento GA₃ en comparación con el control (Cuadro 3.2 y Figura 3.4).

Cuadro 3.1. Área del floema de la nervadura central de las hojas, del pedicelo de bayas y del tallo de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec medidas en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tratamiento	Área del floema		
	Nervadura ($\mu\text{m}^2 10^3$)	Pedicelo ($\mu\text{m}^2 10^3$)	Tallo (mm^2)
Control	34.73 \pm 1.08 b	13.63 \pm 1.21 b	10.16 \pm 0.55 b
ABA	48.81 \pm 1.91 a	19.15 \pm 0.48 a	12.49 \pm 0.53 a
GA ₃	48.76 \pm 6.44 a	19.28 \pm 0.79 a	9.75 \pm 0.41 b

Cuadro 3.2. Área del xilema de la nervadura central de las hojas, del pedicelo de bayas y del tallo de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec medidas en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). También se muestran los valores del área del poro de los vasos xilemáticos de tallos. Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tratamiento	Área del xilema			
	Nervadura ($\mu\text{m}^2 10^3$)	Pedicelo ($\mu\text{m}^2 10^3$)	Tallo (mm^2)	Poro ($\mu\text{m}^2 10^2$)
Control	67.04 \pm 1.69 c	39.64 \pm 1.79 c	19.88 \pm 1.12 c	40.72 \pm 3.42 b
ABA	83.87 \pm 2.52 b	63.17 \pm 2.73 b	23.30 \pm 1.03 b	55.61 \pm 5.00 a
GA ₃	108.85 \pm 1.11 a	113.13 \pm 4.18 a	32.21 \pm 1.69 a	14.45 \pm 1.22 c

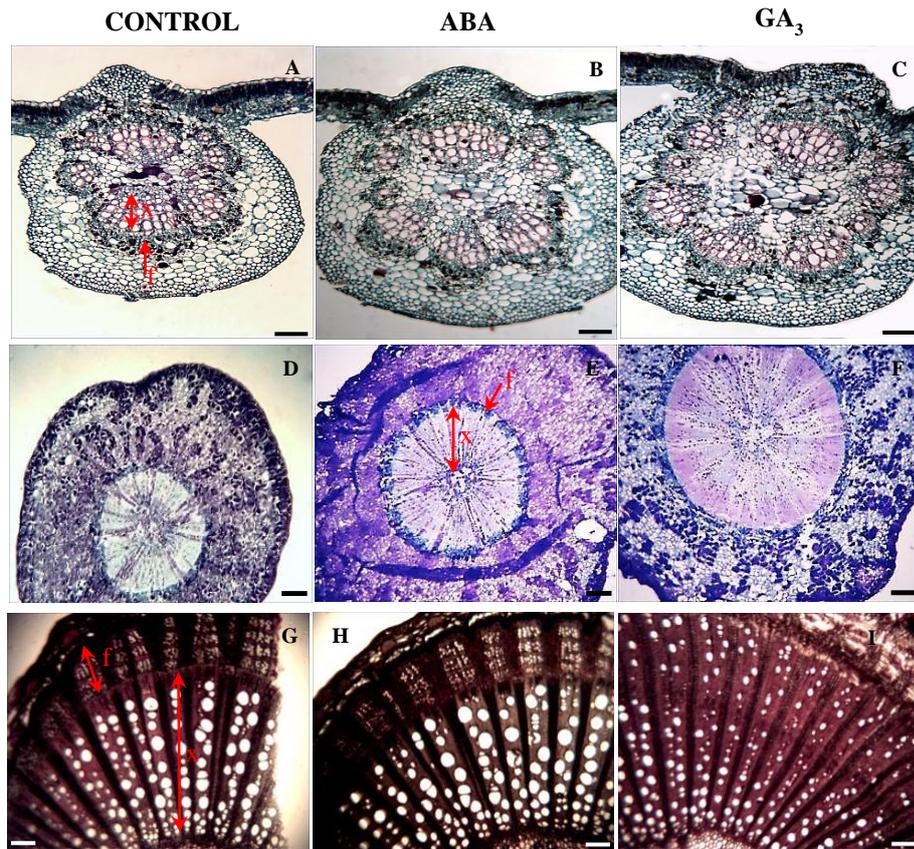


Figura 3.4. Fotografías de las secciones transversales correspondientes a (A-C), nervadura central de hojas; (D-F), pedicelo de bayas y (G-I), tallo de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec tomadas en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). (A), (D), (G), control; (B), (E), (H), ABA; (C), (F), (I), GA₃. La barra de escala corresponde a 100 μm , excepto en las fotografías de las secciones transversales de pedicelos de bayas que corresponden a 50 μm . x: xilema; f: floema.

3.3.2 ABA y GA₃ modifican las concentraciones de carbohidratos no estructurales y ácidos orgánicos en hojas y bayas.

La Figura 3.5 muestra los contenidos de azúcares y de un alditol (sacarosa, glucosa, fructosa e inositol) en hojas de vid durante los tres estadios fenológicos de la baya. Todos los tratamientos mostraron el mismo patrón en la concentración de dichos azúcares solubles a lo largo de la maduración de la baya. El contenido de sacarosa disminuyó desde pre-envero hasta envero, para luego incrementar desde envero hasta post-envero. En envero, las plantas tratadas con ambos reguladores mostraron un mayor contenido de sacarosa, mientras que en post-envero fue el tratamiento control (Figura 3.5 A). Los contenidos de glucosa y fructosa mostraron una caída desde pre-envero hasta envero y se mantuvieron constantes hasta post-envero. Las aplicaciones con ABA y GA₃ mostraron una disminución en la concentración de estas hexosas en cada uno de los momentos fenológicos en comparación con el control (Figura 3.5 B y C). En paralelo, se observó que el pico de concentración del compuesto inositol se produjo en envero en los tres tratamientos. En este caso, solamente el tratamiento GA₃ mostró una disminución significativa de este compuesto en cada uno de los tres estadios fenológicos (Figura 3.5 D).

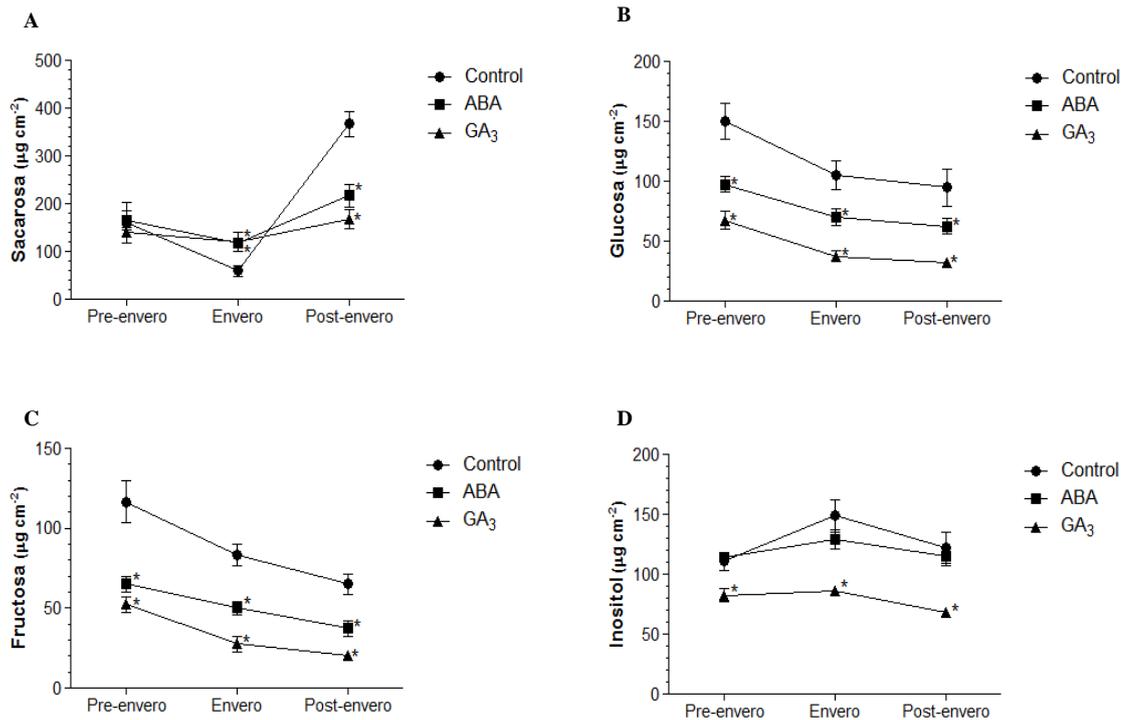


Figura 3.5. Efecto de ABA y GA₃ sobre el contenido de azúcares solubles en hojas ($\mu\text{g cm}^{-2}$). Las determinaciones fueron realizadas en pre-envero (30 DAA), envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-envero (130 DAA). Contenido de (A), sacarosa; (B), glucosa; (C), fructosa; (D), inositol. Los valores corresponden a las medias \pm EE, $n=4$. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada momento de cada tratamiento ($p < 0,05$).

La concentración de los 3 ácidos mayoritarios en hojas de vid (ácido málico, ácido tartárico y ácido cítrico) a lo largo de la maduración de la baya, se muestran en la Figura 3.6. En el caso del ácido málico, los tratamientos ABA y control presentaron una caída en la concentración desde pre-envero hasta envero para luego incrementarse desde envero hasta post-envero; mientras que en las hojas tratadas con GA₃ se observó que las concentraciones se mantuvieron constantes desde pre-envero hasta envero para luego incrementarse desde envero hasta post-envero. En pre-envero, el tratamiento control fue el que presentó el mayor contenido de ácido málico. En envero, las hojas tratadas con ABA presentaron las menores concentraciones, mientras que en post-envero, fue el tratamiento con GA₃ (Figura 3.6 A). Respecto al ácido tartárico, tanto las plantas control como las tratadas con GA₃ mostraron concentraciones constantes desde pre-envero hasta envero para luego caer abruptamente hacia post-envero. El tratamiento ABA presentó una caída constante de la concentración de ácido tartárico desde pre-envero hasta post-envero. En pre-envero, las plantas tratadas con GA₃ fueron las que presentaron los menores contenidos, mientras que en envero no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. En post-envero, las hojas tratadas con los reguladores fueron las que presentaron las concentraciones más bajas de tartrato (Figura 3.6 B). En el caso del ácido cítrico, en el tratamiento con ABA las concentraciones del citrato permanece constante a lo largo de los estadios fenológicos de la baya, mientras que las hojas de las plantas control mostraron el pico de máxima concentración en el estadio de post-envero. Las plantas tratadas con GA₃ presentaron el pico de concentración en envero. Asimismo, estas plantas fueron las que mostraron las máximas concentraciones

en cada uno de los momentos fenológicos. Por otro lado, las hojas tratadas con ABA presentaron los menores contenidos en el estadio de post-envero (Figura 3.6 C). De las tres figuras correspondientes a los tres ácidos orgánicos se desprende que el ácido tartárico es el que se encuentra en mayor abundancia seguido por el ácido málico y por último por el ácido cítrico (Figura 3.6).

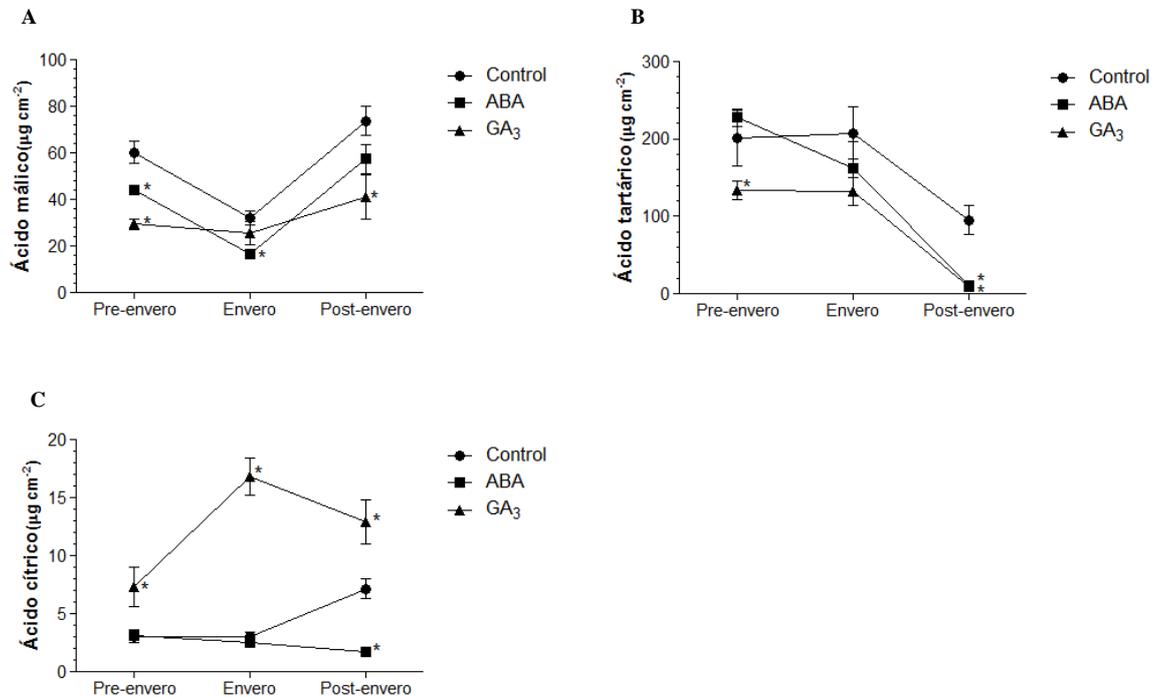


Figura 3.6. Efecto de ABA y GA₃ sobre el contenido de ácidos orgánicos en hojas (µg cm⁻²). Las determinaciones fueron realizadas en pre-envero (30 DAA), envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-envero (130 DAA). Contenido de (A), ácido málico; (B), ácido tartárico; (C), ácido cítrico. Los valores corresponden a las medias ± EE, n=4. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada momento de cada tratamiento (p < 0,05).

La Figura 3.7 muestra las concentraciones de azúcares solubles en bayas de vid cv. Malbec a lo largo de su desarrollo. El contenido de sacarosa incrementa desde pre-envero hasta envero en los tres tratamientos, presentando el tratamiento ABA los menores valores en envero. A partir de este estadio fenológico, la concentración de sacarosa sigue en aumento en las bayas tratadas con ABA, mientras que en las del control y tratadas con GA₃ permanece constante. Es por ello, que las bayas tratadas con ABA mostraron los mayores valores en post-envero (Figura 3.7 A). Las bayas tratadas con ABA acumularon la misma cantidad de glucosa y fructosa que las bayas controles durante la maduración de las mismas (Figura 3.7 B y C). La diferencia radicó en el momento en que las plantas tratadas con ABA llegaron a envero. Mientras las plantas control tardaron 70 DDA, las plantas aplicadas con ABA lo hicieron en 63 DDA. Por otro lado, las plantas tratadas con GA₃ mostraron las mismas concentraciones de glucosa y fructosa que las de los demás tratamientos en envero, y presentaron los mayores contenidos de estos azúcares en post-envero (Figura 3.7 B y C). Al igual que el ABA, GA₃ modificó el momento del inicio de la maduración. En este caso, las bayas tardaron

75 DDA en llegar a envero, es decir, cinco días más que las correspondientes al control (70 DDA).

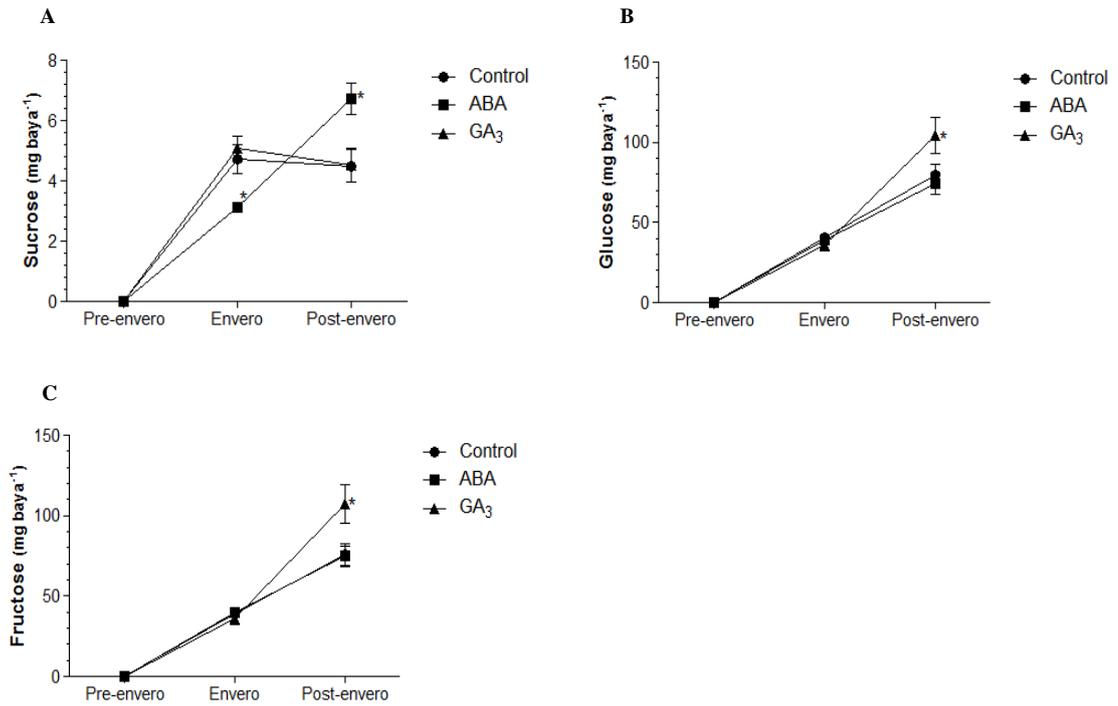


Figura 3.7. Efecto de ABA y GA₃ sobre el contenido de azúcares solubles en bayas (mg baya⁻¹). Las determinaciones fueron realizadas en pre-envero (30 DAA), envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-envero (130 DAA). Contenido de (A), sacarosa; (B), glucosa; (C), fructosa. Los valores corresponden a las medias \pm EE, n=4. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada momento de cada tratamiento ($p < 0,05$).

La Figura 3.8 muestra la concentración de los principales ácidos orgánicos en las bayas de vid (ácido málico, ácido tartárico y ácido cítrico) a lo largo del desarrollo de la baya. De acuerdo a lo esperado, tanto el ácido málico, el ácido tartárico como el ácido cítrico presentaron el pico de concentración en envero. Las bayas tratadas con ABA mostraron las máximas concentraciones de estos ácidos en dicho momento fenológico, mientras que las bayas aplicadas con GA₃ mostraron un mayor contenido del ácido málico, también en envero, en comparación al control (Figura 3.8 A, B y C).

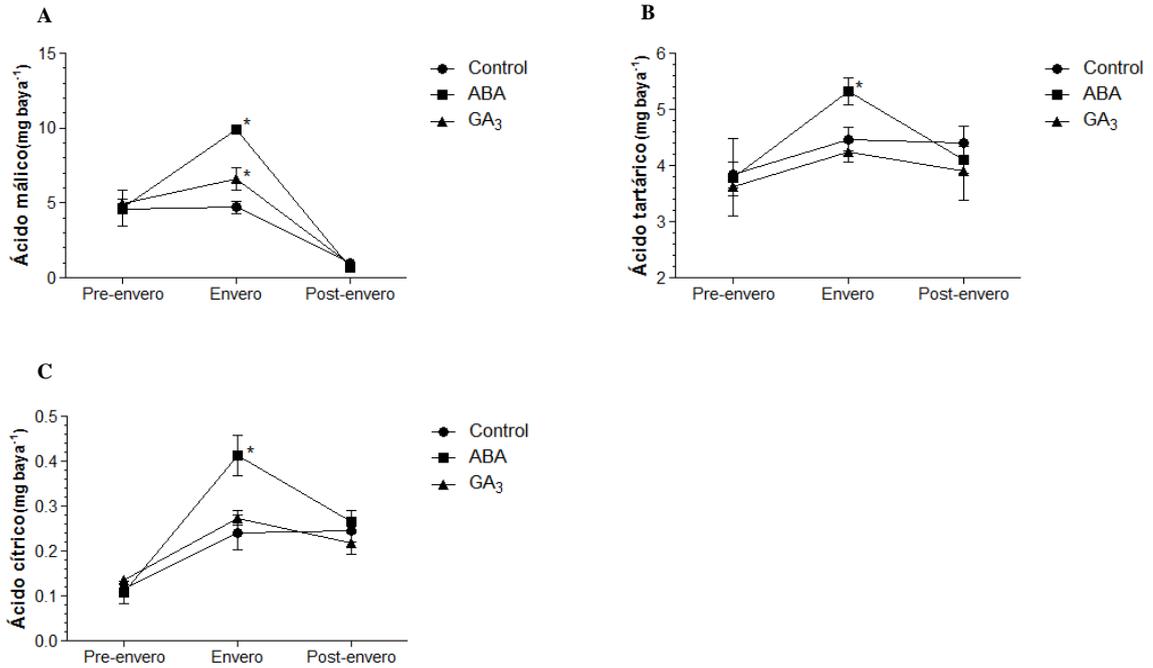


Figura 3.8. Efecto de ABA y GA₃ sobre el contenido de ácidos orgánicos en bayas (mg baya⁻¹). Las determinaciones fueron realizadas en pre-envero (30 DAA), envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-envero (130 DAA). Contenido de (A), ácido málico; (B), ácido tartárico; (C), ácido cítrico. Los valores corresponden a las medias \pm EE, n=4. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada momento de cada tratamiento ($p < 0,05$).

Debido a la caída abrupta del contenido de sacarosa en hojas en envero, teniendo en cuenta que es el principal azúcar transportado desde las hojas hacia los frutos y que la disminución en su concentración en ese momento fenológico pudo deberse al inicio de la gran acumulación de hexosas en frutos, es que se decidió determinar el contenido de almidón y la actividad de las enzimas amilasas en envero. Esto daría cierto indicio del metabolismo de sacarosa, es decir, si el azúcar acumulado como almidón en el estroma de los cloroplastos por acción de la fotosíntesis se estaría desdoblado para generar sacarosa y favorecer la carga floemática en hojas. Los resultados muestran que las aplicaciones con las fitohormonas redujeron significativamente el contenido de almidón en hojas en comparación al control, observándose las menores concentraciones en las hojas tratadas con GA₃. (Figura 3.9 A). Asimismo, la actividad amilasa fue estimulada por GA₃, mientras que no varió entre los tratamientos ABA y control (Figura 3.9 B).

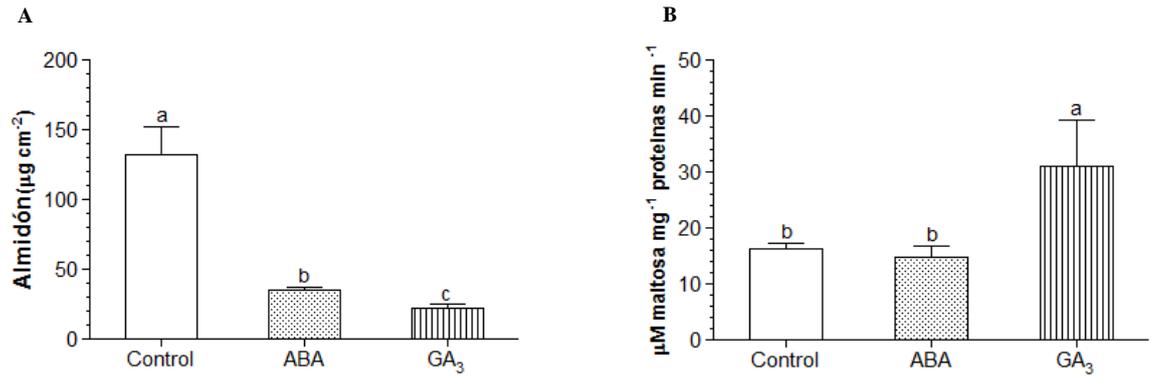


Figura 3.9. Efecto de ABA y GA₃ sobre (A) contenido de almidón en hojas ($\mu\text{g cm}^{-2}$) y (B) actividad amilasa ($\mu\text{M maltosa mg}^{-1} \text{proteínas min}^{-1}$). Las mediciones fueron realizadas en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

3.3.3 GA₃ modifica la conductividad hidráulica máxima de los tallos (k_{max})

Se observó que la k_{max} de los tallos tratados con GA₃ presentó una disminución significativa, de casi la mitad, con respecto a los restantes tratamientos. Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre los valores de k_{max} entre los tratamientos ABA y control (Figura 3.10).

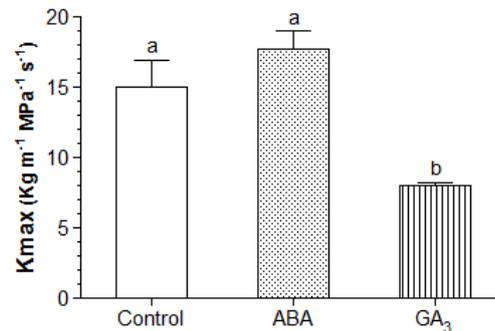


Figura 3.10. Efecto de ABA y GA₃ sobre la conductividad hidráulica de los tallos (k_{max} , $\text{Kg m}^{-1} \text{MPa}^{-1} \text{s}^{-1}$). Las mediciones fueron realizadas en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

3.3.4 ABA y GA₃ afectan el potencial agua de pre-amanecer

De acuerdo a la Figura 3.11, las plantas tratadas con ABA presentaron el potencial agua más elevado (menos negativo), por lo que presentaron órganos más turgentes, mientras que aquellas aplicadas con GA₃ presentaron los valores más bajos (más negativos).

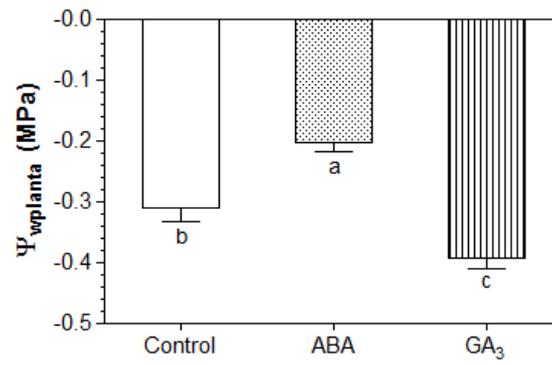


Figura 3.11. Efecto de ABA y GA₃ sobre el potencial agua de las plantas en pre-amanecer ($\Psi_{wplanta}$, MPa). Las mediciones fueron realizadas a los 62 DDA. Los valores corresponden a medias \pm EE, n=8. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

3.4 Discusión

En el capítulo anterior se observó que ABA y GA₃ modificaron la partición de fotoasimilados en las plantas de vid medido en envero. En este sentido, el ABA promovió la alocaación de carbono en los frutos mientras que GA₃ hizo lo propio en los tallos. En el presente capítulo se determinó la dinámica de concentración de los azúcares y ácidos orgánicos tanto en bayas como en hojas, a lo largo del desarrollo del fruto; y su relación con el área de los tejidos vasculares.

En plantas superiores, es bien conocido que la fuerza que moviliza el flujo floemático desde los órganos fuentes hacia los órganos destinos es la diferencia del potencial de turgencia ($\Delta P = \Delta \Psi_p$) entre dos zonas del floema (Taiz y Zeiger 1998). En este sentido, el ΔP está dado por dos componentes P_{fuente} y P_{destino} , por lo tanto $\Delta P = P_{\text{fuente}} - P_{\text{destino}}$ (Keller 2010). En relación a la ecuación anterior, mientras más grande sea el ΔP dado por un incremento del potencial de turgencia de la zona del floema de la fuente y/o por una disminución del potencial de turgencia de la zona del floema de un determinado destino, mayor será la fuerza del destino en particular para atraer hacia sí el flujo de fotoasimilados. Se ha postulado que en aquellas plantas leñosas, como la vid, la carga floemática es pasiva (Slewiniski et al. 2013). Es decir, que la sacarosa difunde libremente, vía plasmodesmos, desde el citoplasma de las células parenquimáticas del mesofilo hacia el complejo elemento criboso: célula de compañía del floema sólo por una diferencia de concentración, incrementando, la P_{fuente} . De este modo, la concentración de sacarosa en el citoplasma de las células del mesofilo debe ser elevada para mantener el transporte. Además, Pastenes et al. (2014) demostraron que en el momento de máxima acumulación de azúcares en bayas, la relación sacarosa: almidón fue elevada en las hojas. De acuerdo a lo anterior, el mayor contenido de sacarosa en hojas tratadas con ABA y GA₃, en envero, podría estar relacionado con una promoción de la carga floemática (mayor P_{fuente}). Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados de actividad amilasa en hojas, el menor contenido de almidón en las plantas tratadas con ABA no se condice con una conversión del polisacárido a sacarosa. En este sentido, el mayor contenido de sacarosa en envero en las plantas tratadas con ABA estaría regulado por otro mecanismo. Una explicación posible a dicho fenómeno podría deberse a que la planta favoreció la síntesis de sacarosa a partir de triosas fosfato, obtenidas de la fotosíntesis, en lugar de almidón, o a partir de hexosas, debido a una disminución en el contenido de estos monosacáridos en las hojas. Por otro lado, la menor concentración de almidón en hojas tratadas con GA₃ se correlacionó con el incremento de la actividad amilasa. En este sentido, el mayor contenido de sacarosa, en envero, en hojas tratadas con dicho regulador de crecimiento, pudo deberse a la acción conjunta de la degradación del almidón y a la síntesis por medio de hexosas. Se ha observado que en especies como las pertenecientes a la familia de las Rosáceas como el manzano, el peral y el duraznero los alditoles como el sorbitol participan en el transporte de esqueletos carbonados desde los órganos fuentes hacia órganos heterotróficos (Zimmermann y Ziegler 1975, Bielek 1982, Moing et al. 1997). Además, autores como Conde et al. (2011a) y Pillet et al. (2012) han comprobado que los alditoles o polioles protegen a las células de las plantas contra el efecto deletéreo del estrés osmótico. En este trabajo se encontró una gran concentración del alditol inositol en hojas adultas de plantas de vid en coincidencia con lo observado por Conde et al. (2014). En este sentido, y al ser la vid una especie resistente a la sequía, las grandes cantidades de inositol presentes (valores cercanos a la concentración de sacarosa) estarían relacionadas con la resistencia de estas plantas al estrés hídrico y no al transporte de fotoasimilados, tal como lo sostienen Conde et al.

(2014). Asimismo, los bajos contenidos de inositol en el tratamiento con GA_3 se correlacionaron con los valores más bajos (más negativos) del potencial agua medidos en pre-amanecer.

Tal como fue observado por Kliewer (1966), los ácidos orgánicos más abundantes en las plantas de vid son: el ácido tartárico y el ácido málico, seguido por el ácido cítrico que se encuentra en muy bajas concentraciones. Por su parte, en hojas, el ácido málico sigue un patrón semejante a la sacarosa en donde las máximas concentraciones se observaron en pre- y post-envero; mientras que el máximo contenido de ácido tartárico se registró en pre-envero y envero. En ambos casos, las mayores concentraciones se observaron en el tratamiento control. Por otro lado, el tratamiento GA_3 produjo un incremento del ácido cítrico durante los 3 estadios fenológicos en las hojas de vid.

En relación a las bayas, si bien no se observaron modificaciones en el contenido de glucosa y fructosa en envero entre los 3 tratamientos, dicho estadio fenológico se registró a los 63 DDA en el tratamiento con ABA, a los 70 DDA en el tratamiento control y a los 75 DDA en el tratamiento con GA_3 . Las diferencias en las fechas se correlacionaron con la partición de fotoasimilados discutidos en el capítulo anterior. En donde el retraso en el inicio de la maduración de las bayas en el tratamiento con GA_3 se debió al crecimiento exacerbado de los tallos. Es decir, que la mayor cantidad de fotoasimilados fue translocado desde las hojas hacia los tallos en lugar de las bayas. Sin embargo, al observar el contenido de hexosas en las bayas de post-envero se registró un incremento en aquellos frutos aplicados con GA_3 . En este sentido, es posible que una vez que culminado el crecimiento en altura, la planta derivó una mayor cantidad de fotoasimilados desde las hojas hacia las bayas. Por otro lado, los resultados obtenidos con la aplicación de ABA se corresponden con aquellos observados por Wheeler et al. (2009) en bayas del cv. Cabernet Sauvignon. Tanto el adelanto en el inicio de la maduración como el mayor contenido de hexosas por unidad de baya en ABA y GA_3 , respectivamente, se correlacionó con el crecimiento del área vascular en hojas, tallos y pedicelos de bayas. Por otro lado, la mayor concentración de los ácidos orgánicos se observó, como era de esperarse, en envero. Asimismo, el tratamiento ABA mostró los mayores contenidos de ácidos, debido, posiblemente, a un mayor flujo de fotoasimilados desde las hojas hacia las bayas durante envero. Además, se observó que el ácido málico fue el menos estable de los dos más abundante en bayas, ya que a partir de envero sufrió una caída abrupta de su concentración, debido posiblemente a que fue respirado o metabolizado a azúcares (Conde et al. 2007).

Además de determinar la concentración de sacarosa en el mesofilo de las hojas para inferir la carga floemática (P_{fuente}), se investigó si las fitohormonas producían algún efecto sobre la anatomía vascular de hojas, tallos y pedicelos de bayas. Se sabe que el crecimiento en altura de las plantas tiene que ir acompañado con un sistema eficiente en el transporte de agua, nutrientes y asimilados desde las raíces hasta las hojas y viceversa (Tyree 2003). A su vez el tallo debe aumentar su resistencia para poder sostener la carga creciente de hojas y frutos. Para ello el leño crece en diámetro aumentando el número de vasos xilemáticos que conducirán el agua y los nutrientes hacia las células de los órganos en continuo crecimiento. Asimismo este incremento va acompañado de un aumento en el grosor de las paredes de las células parenquimáticas como de una mayor lignificación de las mismas y de un mayor número de fibras xilemáticas. Por otra parte Demura y Ye (2010) afirman que el xilema es el destino que más biomasa acumula en plantas perennes dicotiledóneas. De acuerdo a esto, las plantas de vid aplicadas con GA_3

presentaron un retraso de 5 días en la maduración de las bayas (en relación al control), debido a un cambio en la fuerza de los destinos siendo superior la del tallo que la del racimo. Asimismo, el mayor contenido de hexosas en post-envero se pudo deber a que la planta dejó de formar paredes celulares y comenzó a acumular glucosa y fructosa en las vacuolas de las bayas. Cuando se observaron los cortes transversales de tallo en los distintos tratamientos, se vió un incremento en el desarrollo de xilema en el tratamiento con GA_3 pero con una disminución significativa en el área transversal de los vasos. Caso contrario ocurrió en las aplicaciones con ABA en donde el desarrollo del xilema fue semejante al control pero con vasos de mayor diámetro, en concordancia con lo observado por Rancic et al. (2007). El pequeño tamaño de los vasos xilemáticos en el tratamiento con GA_3 favorecería el ascenso del agua a mayor altura, sin el constante peligro de que la columna de líquido sufra cavitación. A expensas de esto habría un incremento en la diferencia de presión generada entre las hojas y la raíz por una mayor resistencia hidráulica según la ley de Hagen-Poiseuille (Tyree 2003). En este sentido, las plantas aplicadas con GA_3 mostraron una disminución significativa de la conductividad hidráulica de sus tallos. Por otro lado, el mayor tamaño del área de los vasos xilemáticos en el tratamiento ABA no trajo aparejado un incremento en la conductividad hidráulica. A pesar de ello, las plantas aplicadas con ABA mostraron un mejor estado hídrico, demostrado por los mayores valores de potencial agua en pre-amanecer. Lo contrario se observó en las plantas tratadas con GA_3 . Por otro lado, asumiendo que existe una correlación entre el área del floema y el número de tubos cribosos (Canny 1973), el mayor desarrollo del floema en hojas, tallos y pedicelos de bayas en las plantas tratadas con ambas fitohormonas sería una de las razones por la cual ABA y GA_3 favorecieron el transporte de fotoasimilados.

En relación a los resultados obtenidos en ésta sección, se puede aceptar parcialmente la hipótesis de trabajo II. Es decir, ABA y GA_3 sí promueven el crecimiento del floema y xilema en hojas, tallos y pedicelos de bayas mejorando el transporte de fotoasimilados hacia las bayas y tallos respectivamente. Sin embargo, el mayor desarrollo del xilema no se tradujo en un aumento de la conductividad hidráulica de los tallos. Por otro lado, se acepta completamente la hipótesis de trabajo III, ya que ABA y GA_3 modifican diferencialmente el perfil de azúcares y ácidos orgánicos en hojas y bayas de vid cv. Malbec.

Capítulo 4: Efecto regulador del ABA y GA₃ sobre la expresión de genes que codifican para transportadores de azúcares en hojas y bayas de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.

4.1 Introducción

A pesar de lo observado en el capítulo anterior, en donde se estableció que las plantas leñosas como la vid presentan una carga floemática pasiva mediada por plasmodesmos, algunos reportes sugieren que una carga activa (gasto de energía), mediada por transportadores de azúcares, podría estar ocurriendo de forma paralela (Afoufa-Bastien et al. 2010, Hayes et al. 2010, Medici et al. 2014, Pastenes et al. 2014). Por otro lado, la pérdida de permeabilidad de los plasmodesmos entre el complejo elemento del tubo criboso:célula acompañante y las células parenquimáticas del mesocarpo durante la acumulación rápida de azúcares en las bayas, sería la responsable de la sobre expresión de los genes que codifican para transportadores de azúcares en estos órganos (Zhang et al. 2006). En este sentido, la carga y descarga apoplástica involucra la actividad de proteínas transportadoras tanto de sacarosa como de hexosas para que los azúcares puedan atravesar las membranas biológicas. Se ha demostrado que el transporte de solutos desde el exterior hacia el interior de las células conlleva un gasto de energía indirecto en forma de ATP mediante la activación de bombas H^+ -ATPasas. Esto provoca cambios físico-químicos a nivel de membrana induciendo una caída del potencial interno entre -150 a -200 mV y una disminución del pH apoplástico a valores entre 4 y 5; todo esto en conjunto genera un gradiente electroquímico que sería la fuerza motriz para el ingreso de los azúcares, a través de transportadores específicos, en contra de un gradiente de concentración (Sondergaard et al. 2004).

En plantas, *AtSTP1* (del inglés, *Arabidopsis thaliana* SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1) fue el primer transportador de monosacáridos (MST, del inglés, Monosaccharide Transporter) identificado y funcionalmente caracterizado como hexosa-protón simporter (Sauer et al. 1990). El genoma de *Arabidopsis* presenta 53 secuencias homólogas de MSTs distribuidos en 7 clusters (Büttner 2007), presentando, todos ellos, 12 dominios transmembranas (Williams et al. 2000, Delrot et al. 2001). En vid, 59 transportadores de hexosas putativos han sido identificados de acuerdo al reconocimiento de motivos proteicos del genoma completo (Samson et al. 2004, Jaillon et al. 2007). Sin embargo, sólo 6 cADNs que codifican para MST, denominados *VvHT1-6* (del inglés, *Vitis vinifera* HEXOSE TRANSPORTER, *VvHT1* AJ001061, *VvHT2* AY663846, *VvHT3* AY538259 y AY854146, *VvHT4* AY538260, *VvHT5* AY538261, *VvHT6* AY861386, DQ017393), han sido clonados de las variedades Pinot noir, Ugni blanc, Chardonnay, Cabernet Sauvignon y Syrah (Fillion et al. 1999, Vignault et al. 2005, Hayes et al. 2007). Por su parte, *VvHT6* está relacionado con *AtTMT2*, que es un miembro de la subfamilia TMT (del inglés, Tonoplast Monosaccharide Transporter) dentro de la superfamilia MST. Las proteínas *AtTMTs* son hexosas-protón antiporters del tonoplasto vacuolar. Estos transportadores tienen la particularidad de ser inducidos por estreses abióticos como frío y sequía y se cree que tendrían un rol central como sensores de estas señales (Wormit et al. 2006). Por otro lado, la actividad de las proteínas *VvHT1*, *VvHT4* y *VvHT5* ha sido demostrada mediante su expresión en sistema de heterólogos como la levadura mutante EBY VW 4000 deficiente de transportadores de hexosas (Wieczorke et al. 1999). Estos transportadores presentan una alta afinidad debido a la baja constante de Michaelis-Menten (K_m) en relación al sustrato D-[U- ^{14}C] glucosa marcada radioactivamente. En este sentido, la proteína *VvHT1* exhibió la máxima afinidad por la glucosa (K_m de 70 μM , V_{max} alrededor de 14 $\mu mol\ min^{-1}\ g\ FW^{-1}$) comparado con *VvHT4* y *VvHT5* (K_m alrededor de 150 μM y 100 μM

respectivamente, V_{\max} alrededor de 5 y 0,15 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g FW}^{-1}$, respectivamente). Además, VvHT3 no fue capaz de transportar ningún azúcar marcado radioactivamente en el modelo estudiado (Vignault et al. 2005, Hayes et al. 2007). Asimismo, los intentos para demostrar la actividad transportadora de las proteínas VvHT2 y VvHT6 en levadura han sido poco exitosos. Por su parte, la localización de los transportadores VvHT1, VvHT3, VvHT4 y VvHT5 en la membrana plasmática ha sido confirmada por ensayos de inmunofluorescencia, inmunomarcación y GFP (del inglés, Green Fluorescence Protein) fusionado al extremo C terminal. Sin embargo, VvHT2 y VvHT6 parecerían estar expresados en el tonoplasto (Vignault et al. no publicado). La expresión de los transportadores de azúcares está principalmente asociada con órganos destino. Por lo que en bayas, los genes *VvHT1*, *VvHT2* y *VvHT3* se encuentran altamente expresados, comparados con los otros *VvHTs*, en todos los estadios de desarrollo. No obstante, algunos patrones específicos de expresión pueden ser distinguidos a lo largo de la maduración, por ejemplo: tanto los transcritos como los niveles de proteínas del gen *VvHT1* son mucho más elevados en pre-envero (Conde et al. 2006), mientras que la expresión del gen *VvHT5*, aunque débil, está mayormente asociada con estadios tardíos de la maduración. La acumulación de los transcritos del gen *VvHT3* es muy baja en envero pero elevada tanto en pre-envero como en post-envero (Hayes et al. 2007), mientras que la expresión de los genes *VvHT2* y *VvHT6* es elevada en envero, sugiriendo que estos transportadores son responsables de la acumulación de hexosas durante el inicio de la maduración (Terrier et al. 2005, Vignault et al. 2005, Deluc et al. 2007, Hayes et al. 2007). De acuerdo a Hayes et al. (2007), la acumulación de azúcares en las bayas podría ser debida a los transportadores VvHT2 y VvHT3 aunque su actividad como tal no haya sido aún demostrada. Asimismo, las proteínas VvHT4 y VvHT5 también podrían estar involucradas, aunque, en menor medida (Hayes et al. 2007). En el caso de las hojas, los transcritos *VvHT1* y *VvHT3* son los más abundantes, tanto en hojas jóvenes como en adultas. Además, la expresión de *VvHT1*, *VvHT3* y *VvHT5* es incrementada en la transición de destino a fuente. Contrariamente, los niveles del transcrito *VvHT2* se mantienen constantemente bajos, indicando una asociación preferencial con la actividad de los órganos destino (Hayes et al. 2007).

Por otro lado, la proteína SoSUT1 (del inglés, *Spinacia oleracea* SUCROSE TRANSPORTER 1) fue el primer transportador de sacarosa (DST, del inglés Dissacharaide Transporter) caracterizado funcionalmente (Riesmeier et al. 1992). Los genes DST, que pertenecen a una pequeña familia multigénica con 9 miembros en *Arabidopsis* y 4 en tomate, codifican para polipeptidos de 55 KD (*Arabidopsis* Genome Initiative 2000, Delrot et al. 2001, Sauer et al. 2004, Hackel et al. 2006). Debido a la secuenciación del genoma completo de vid (Jaillon et al. 2007, Velasco et al. 2007), se pudo determinar que los genes que codifican para transportadores de sacarosa en esta especie constituyen una pequeña familia multigénica de 4 miembros. Sin embargo, sólo 3 DST cADNs han sido clonados y caracterizados de las variedades Syrah y Cabernet Sauvignon (*VvSUC11*; AF021808, también identificado como *VvSUT1* AF182445; *VvSUC12* AF021809; *VvSUC27*, AF021810). Tanto *VvSUC11* como *VvSUC12* son transportadores de sacarosa de intermedia afinidad (K_m , 0,9 mM y 1,4 mM, respectivamente, Ageorges et al. 2000, Manning et al. 2001), mientras que *VvSUC27* presenta un K_m alrededor de 10 mM y, por lo tanto, se comporta como un transportador de sacarosa de baja afinidad (Zhang et al. 2008). *VvSUC11* está altamente expresado en flores y frutos, mientras que la expresión de *VvSUC12* se encuentra restringida a bayas y hojas jóvenes. Asimismo, *VvSUC11* se expresa en hojas jóvenes y adultas. Por otro lado, la expresión de *VvSUC27* se encuentra relacionada con la actividad de órganos

destinos, ya que sus transcritos son fuertemente acumulados en flores, bayas inmaduras, raíces y zarcillos, pero débilmente acumulados en hojas maduras (Davies et al. 1999).

Junto con los transportadores de azúcares, las enzimas invertasas (INVs) y sacarosa sintasas (SS) participan en el mantenimiento del gradiente de sacarosa necesario para sustentar el flujo masal de la savia floemática desde la fuente hasta los destinos. Además, al ser reguladoras del contenido de azúcares, estas enzimas jugarían un papel importante en el contexto de la señalización de tales moléculas (Delrot 1994, Roitsch et al. 1995, Sherson et al. 2003, Koch 2004). Las INVs son hidrolasas que clivan la sacarosa en glucosa y fructosa. En *Arabidopsis* y en tomate, las INVs son codificadas por una pequeña familia de genes cuyos patrones de expresión están supeditados al órgano y a estímulos ambientales y metabólicos (Godt y Roitsch 1997, Sherson et al. 2003). Asimismo, estas enzimas pueden ser ácidas o neutras. Las INVs ácidas, tales como cwINV (del inglés, cell wall INVERTASE) y vINV (del inglés, vacuolar INVERTASE) están localizadas en la pared celular y en la vacuola, respectivamente, mientras que nINV (del inglés, neutral INVERTASE), la forma neutra, está presente en el citoplasma. En vid, la secuencia de cADN de cwINV (AY538262) junto con su promotor, la secuencia completa de cADN de nINV (*NINI*, EU016365) como así también 3 secuencias genómicas incompletas y 2 cADNs correspondientes a vINVs (*VvGIN1* AAB47171.1 y *VvGIN2* AAB47172.1) han sido clonados (Davies y Robinson 1996, Hayes et al. 2007). De acuerdo al análisis de motivos proteicos del genoma completo de la vid, se han podido identificar de 10 a 12 genes putativos que codifican para nINVs y 10 genes putativos que codifican para INVs ácidas (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/Vitis-vinifera-whole-genome.html>). En relación a los niveles de expresión en bayas, trabajos de Zhang et al. (2006) y Hayes et al. (2007) demuestran que los transcritos de *VvcwINV* son inducidos a partir de envero. Por otro lado, la expresión de *VvGIN1* y *VvGIN2* es elevada en pre-envero para caer durante envero y post-envero (Davies y Robinson 1996, Sarry et al. 2004, Deluc et al. 2007).

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Material vegetal y condiciones experimentales

Tanto las plantas de vid como las condiciones experimentales utilizadas en este capítulo se corresponden con las del capítulo 2.

4.2.2 Extracción de ARN

El ARN se extrajo tanto de hojas adultas como de bayas de 4 plantas de vid por tratamiento. En ambos casos se homogenizó el tejido en mortero con N₂ líquido, en el caso de bayas se descartaron previamente las semillas, y se utilizó 400 mg de tejido fresco para continuar con la extracción de acuerdo al protocolo descrito por Reid et al. (2006) con modificaciones. Las muestras de bayas se extrajeron en los tres momentos fenológicos debido a los grandes cambios bioquímicos y moleculares que ocurren a lo largo de su maduración; mientras que las muestras de hojas se extrajeron únicamente en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃), coincidente con el inicio de la acumulación rápida de hexosas en el fruto y con la caída abrupta de sacarosa en las hojas.

Los 400 mg de tejido fresco congelado se colocaron en un tubo eppendorf de 2 mL, conteniendo 800 µL del buffer de extracción precalentado a 65 °C (2 % CTAB, 2 % PVP40, 300 mM de una solución 1 M de Tris-HCl pH 8, 25 mM de una solución 0,5 M de EDTA, 2 M de una solución 5 M de NaCl, 0,05 % de espermidina), se le adicionó 20 µL de β-mercaptoetanol y se mezcló suavemente por inversión del tubo. Los tubos se incubaron a 65 °C durante 10-15 min y se agitaron 2-3 veces durante la incubación. Se dejaron enfriar durante 5 min y se adicionó 800 µL de una mezcla de cloroformo: isoamílico, 24:1. Se agitaron suavemente y se centrifugaron a 13200 rpm durante 10 min a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se lo colocó en un nuevo tubo, agregando nuevamente 800 µL de la mezcla de cloroformo: isoamílico, 24:1. Nuevamente se centrifugó a 13200 rpm durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se lo colocó en otro tubo. Luego, se agregó 100 µL de acetato de sodio (NaOAc) 3 M y 600 µL de isopropanol puro. Se mezcló cuidadosamente y se colocaron los tubos en freezer -80 °C durante 15 min. Una vez transcurrido el tiempo, los tubos se centrifugaron a 13200 rpm durante 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se adicionó 500 µL de TE pH 8, se agitó suavemente para resuspender el pellet y se agregó 125 µL de LiCl 10 M. Se mezcló con cuidado y se dejó incubando toda la noche en heladera a 4 °C. Al otro día, los tubos fueron centrifugados a 13200 rpm durante 30 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de etanol al 70 % frío (-20 °C) y se resuspendió el pellet suavemente. Posteriormente, se centrifugó a 13200 rpm durante 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Por último, se resuspendió el pellet en 50 µL de H₂O libre de ADNasas y ARNasas.

4.2.3 Purificación y retrotranscripción

El ARN extraído mediante el protocolo antes descrito, se lo pasó por columnas y se lo trató con ADNasas utilizando el kit RNeasy mini spin columns y RNase-Free DNase set (QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo el protocolo que describe el fabricante. Una vez

hecho esto, el ARN total se cuantificó mediante espectrofotómetro a 260 nm y 500 ng se corrieron en gel al 1 % de agarosa para verificar su integridad. Luego, se utilizó 1 µg de ARN total para realizar la retrotranscripción utilizando random primers y el kit enzimático RevertAid (FERMENTAS Vilnius, Lithuania) de acuerdo al protocolo del fabricante.

4.2.4 Experimentos de PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo mediante el uso de un termociclador ABI Step One (Applied Biosystems, Warrington, UK) utilizando un volumen final de reacción de 15 µL, de los cuales 7,5 µL correspondieron al buffer SYBR GREEN, 0,9 µL a cada cebador con una concentración de 10 µM, 3 µL al cADN con una dilución 1:10 y 2,7 µL al H₂O libre de ADNasas y ARNasas. Se utilizó el ciclo de amplificación universal con el siguiente programa: 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos con 15 s a 95 °C de desnaturalización y 60 s a 60 °C para renaturalización y extensión, luego se hizo la curva de melting para verificar si el par de cebadores amplificaban un solo producto de reacción (especificidad y eficiencia), en este caso el programa fue: 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 60 s y 95 °C durante 15 s, leyendo cada 0,3 °C desde los 60 °C a los 95 °C. Para todos los experimentos se utilizó el gen factor de elongación 1- α (*Vv EF 1- α*) como control endógeno. En los experimentos de hoja se utilizó la muestra control como muestra de referencia, mientras que para los experimentos de bayas se usó la muestra control pre-verano como muestra de referencia.

Los cebadores fueron diseñados mediante el programa Beacon Designer versión 7.70 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA), utilizando las secuencias del genoma completo de la vid PN40024, correspondiente a la variedad de vid Pinot Noir altamente homocigota y las secuencias de EST disponibles en el banco de datos del NCBI (Cuadro 4.1). La expresión relativa de cada gen se calculó utilizando la ecuación 1 publicada por Pfaffl (2001).

Cuadro 4.1. Secuencias y eficiencias de cebadores de los genes utilizados en los experimentos de PCR en tiempo real.

Gen	Forward	Reverse	Eficiencia
<i>VvGIN1</i>	5'-CCATGAGGGTTCTGGTTGAT-3'	5'-CAGTGGCATTGTTGAAGAGG-3'	95 %
<i>VvcwINV</i>	5'-TCTGGGAAACAGTTACTGCAATGG-3'	5'-ACGATATCTCCACATCTGCCTGTG-3'	105 %
<i>VvHT1</i>	5'-ACAAGTCCACGAATCAGTA-3'	5'-CTCCGAATAGCATTGACAG-3'	98 %
<i>VvHT2</i>	5'-GAGGTGTAACAACGATGC-3'	5'-AGTGAGGATGTGAATGCT-3'	81 %
<i>VvHT3</i>	5'-GTGACAGTTGCCATAATCC-3'	5'-GACCATCCGAATGCTATAAC-3'	91 %
<i>VvHT5</i>	5'-GAAGCGACATTGATAAGGTT-3'	5'-TGATAACGATAGGAGTGATCTT-3'	91 %
<i>VvHT6</i>	5'- CTGTTCCGGTAGTGTCCAT-3'	5'- CTGTAGGCTCTCTTCATCC-3'	98 %
<i>VvSUC12</i>	5'-TGGATAACTTCCCTGCCTCA-3'	5'-CGGATGATAGTAGAACCACTTGAC-3'	98 %
<i>VvSUC27</i>	5'-GGAAGAAGAGGCATACAGTA-3'	5'-GGAGGAGAAGAGGATTGG-3'	94 %
<i>VvEF-1α</i>	5'- GCAGCCAAGAAGAAGTGAAG-3'	5'- CCAAGGAAGAAGGCAGAAAAC-3'	100 %

4.2.5 Análisis de datos

Para analizar los datos de expresión relativa de genes se utilizó la prueba de permutación mediante el programa InfoStat (<http://sites.google.com/site/fgstatistics>). La generación del mapa de temperatura de la expresión de los genes analizados fue realizada mediante el software Genesis versión 1.7.7.

4.3 Resultados

4.3.1 ABA y GA₃ modifican la expresión de los genes transportadores de azúcares en hojas y bayas

Se cuantificó la expresión relativa de 6 genes transportadores de azúcares (*VvHT1*, *VvHT3*, *VvHT5*, *VvHT6*, *VvSUC12* and *VvSUC27*) y dos genes de desdoblamiento de la sacarosa presentes en vacuola (*VvGIN1*) y pared celular (*VvcwINV*). En hojas se observó que el ABA sobre expresó los genes *VvHT1* y *VvGIN1* en 3 y 6 veces respectivamente, en comparación con el control (Figura 4.1 A y G). Por otro lado, los genes *VvHT3*, *VvHT5* y *VvHT6* disminuyeron su expresión en 2, 3 y 1,6 veces respectivamente, en dicho tratamiento, en comparación con el control (Figura 4.1 B, C y D). Además, los genes transportadores de sacarosa mostraron una disminución significativa en su expresión, también en el tratamiento ABA, de 1,6 veces en relación al control. Las aplicaciones con GA₃ redujeron la expresión de los genes *VvHT3* y *VvHT5* en 3 y 1,6 veces en comparación al control (Figura 4.1 B y C). Asimismo, la transcripción del gen *VvSUC27* se vio reducida en 10 veces (Figura 4.1 F). Contrariamente, el gen que codifica para la invertasa vacuolar *VvGIN1* fue sobre expresado aproximadamente 30 veces en comparación al control (Figura 4.1 G); mientras que los genes *VvHT1*, *VvHT6* y *VvSUC12* y *VvcwINV* permanecieron inalterados respecto al control (Figura 4.1 A, D, E y H).

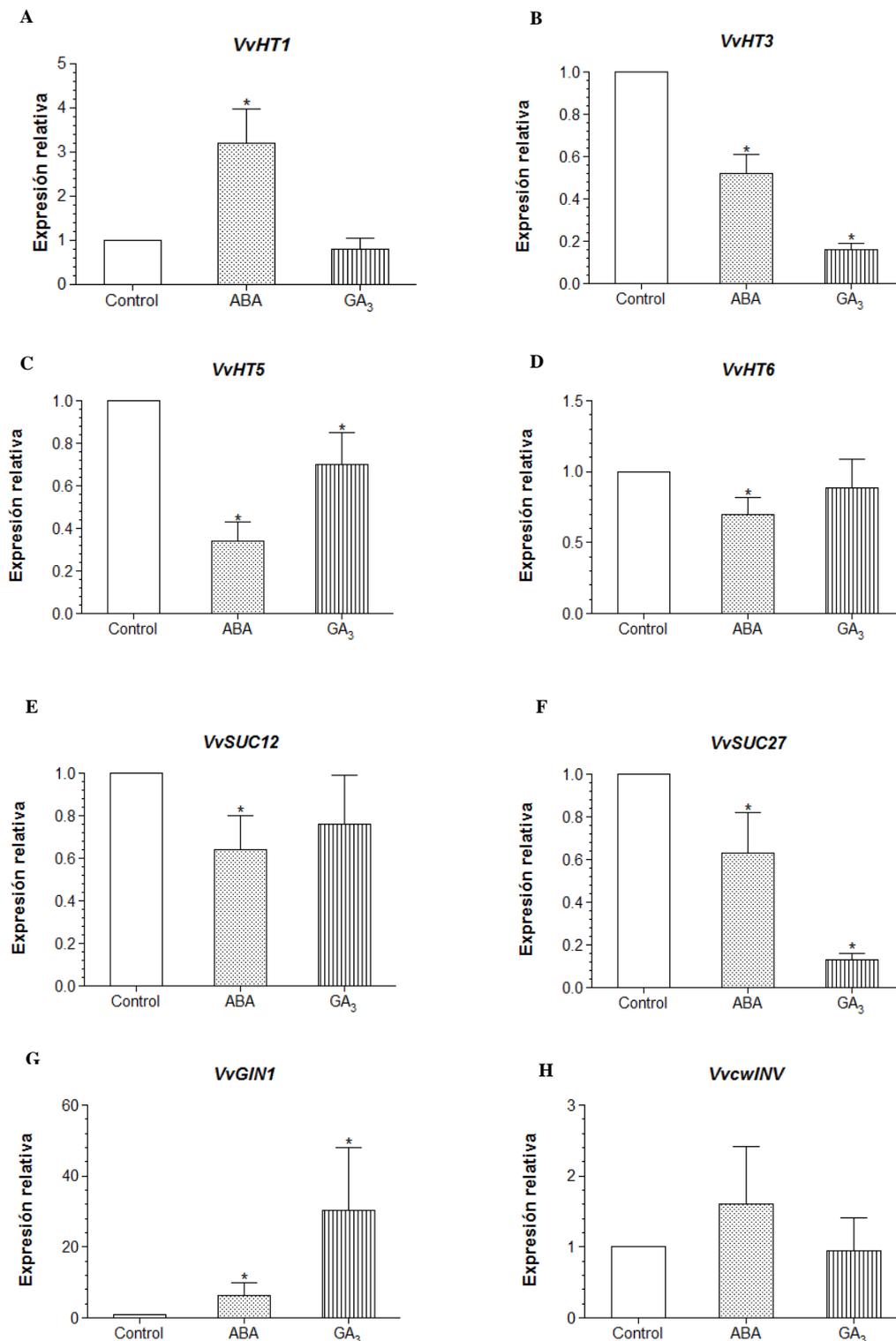


Figura 4.1. Efecto de ABA y GA₃ sobre la expresión de genes que codifican para transportadores de azúcares e invertasas medidas en hojas en invierno (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Se muestran las expresiones relativas de (A), *VvHT1*; (B), *VvHT3*; (C), *VvHT5*; (D), *VvHT6*; (E) *VvSUC12*; (F) *VvSUC27*; (G) *VvGIN1*; (H), *VvcwINV*. Los valores corresponden a medias de 4 repeticiones biológicas y tres técnicas \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada tratamiento y el control mediante la prueba de permutación ($p < 0,05$). Todos los valores fueron normalizados utilizando el gen endógeno *VvEF 1- α* .

La Figura 4.2 muestra la expresión relativa de los genes transportadores de hexosas en bayas de vid a lo largo de su maduración. Se los puede dividir en tres grupos en donde *VvHT1* y *VvHT3* presentan picos de expresión en pre- y post-envero, mientras que se observa una marcada caída en el estadio de envero (Figura 4.2 A y C). Los genes *VvHT2* y *VvHT6* presentan un comportamiento inverso, en donde las máximas expresiones se observaron en envero (Figura 4.2 B y E); mientras que el gen *VvHT5* presentó sólo una mayor expresión en post-envero (Figura 4.2 D). En relación al gen *VvHT1*, el tratamiento con GA₃ incrementó su expresión en pre-envero. En post-envero, ambos reguladores provocaron una disminución de su transcripción respecto al control (Figura 4.2 A). La expresión del gen *VvHT2* se vio significativamente incrementada en envero con el tratamiento ABA, mientras que en el mismo momento fenológico las bayas tratadas con GA₃ mostraron una disminución de su expresión respecto al control. Contrariamente, mientras las bayas ABA y control presentaron una caída en la expresión del gen *VvHT2* en post-envero, las tratadas con GA₃ mostraron un incremento en su expresión siendo significativamente diferente al control (Figura 4.2 B). El gen *VvHT3* presentó una mayor expresión en envero en aquellas bayas tratadas con ABA y una menor expresión en las tratadas con GA₃ en relación al control. En post-envero, al igual que con *VvHT2*, el tratamiento GA₃ mostró la mayor expresión (Figura 4.2 C). Por otro lado, la transcripción del gen *VvHT5* se vio estimulada por las aplicaciones de ABA, mientras que se vio inhibida por la presencia de GA₃ (Figura 4.2 D). Las bayas tratadas con ABA presentaron una sobre expresión del gen *VvHT6* en envero, a diferencia de las tratadas con GA₃ que mostraron los menores valores de expresión en ese estadio en comparación al control (Figura 4.2 E).

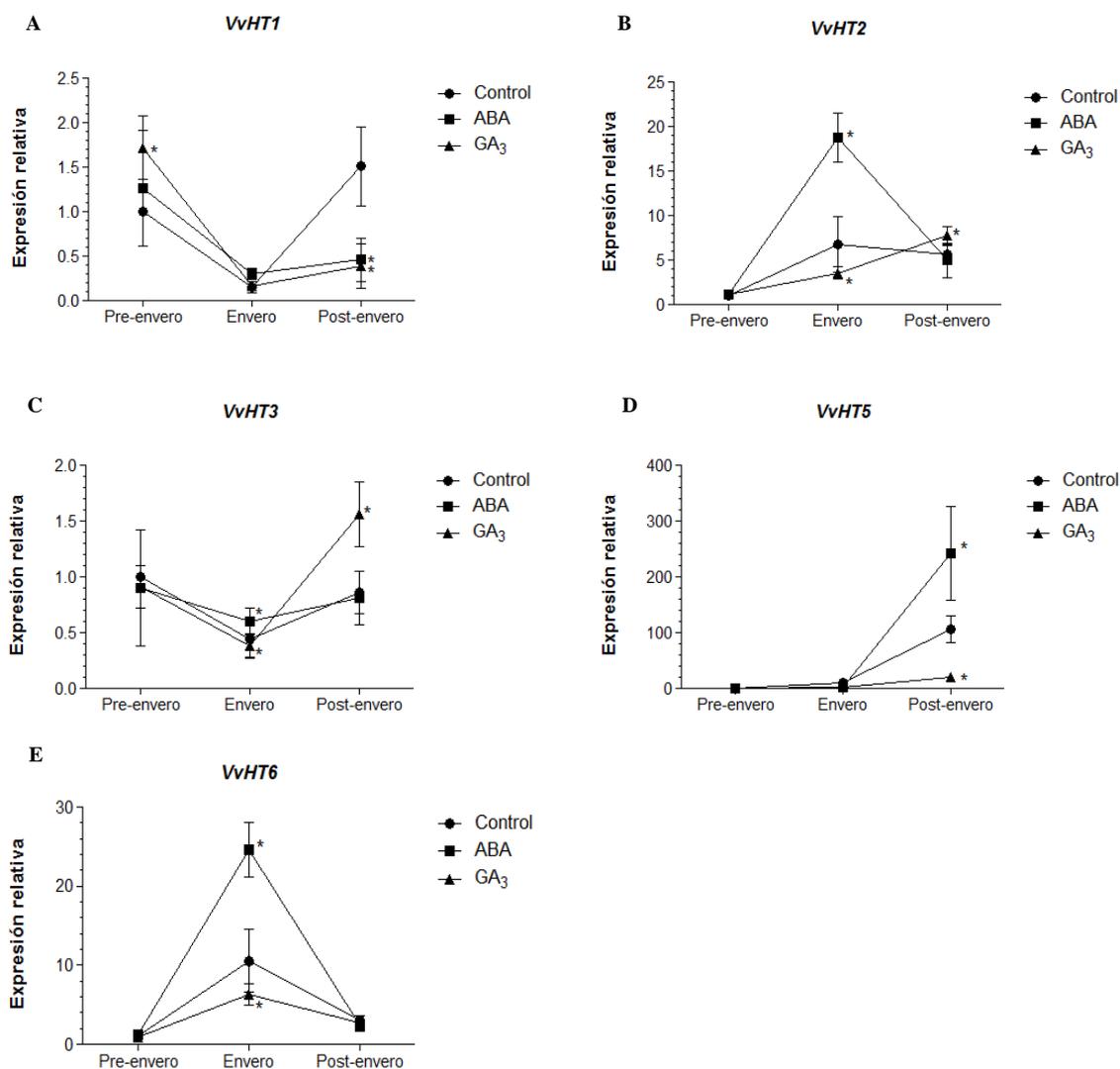


Figura 4.2. Efecto de ABA y GA₃ sobre la expresión de genes que codifican para transportadores de hexosas medidas en bayas en pre-verano (30 DDA), enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-verano (130 DDA). Se muestran las expresiones relativas a lo largo del desarrollo de la baya de (A), *VvHT1*; (B), *VvHT2*; (C), *VvHT3*; (D), *VvHT5*; (E), *VvHT6*. Los valores corresponden a medias de 4 repeticiones biológicas y tres técnicas \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada tratamiento y el control mediante la prueba de permutación ($p < 0,05$). Todos los valores fueron normalizados utilizando el gen endógeno *VvEF 1- α* y se utilizó la muestra control pre-verano como muestra de referencia.

La Figura 4.3 muestra la expresión de los genes transportadores de sacarosa en bayas de vid a lo largo de su maduración. Se puede observar que presentan patrones de transcripción opuestos, es decir, el gen *VvSUC27* mostró la mayor expresión en pre-verano (bayas verdes), mientras que el gen *VvSUC12* lo hizo en post-verano (bayas maduras). En ambos casos sólo se observó diferencias significativas en relación a la transcripción con el tratamiento GA₃. El mismo presentó una sobre expresión en el gen *VvSUC27* en pre-verano y una sub expresión en el gen *VvSUC12* en post-verano.

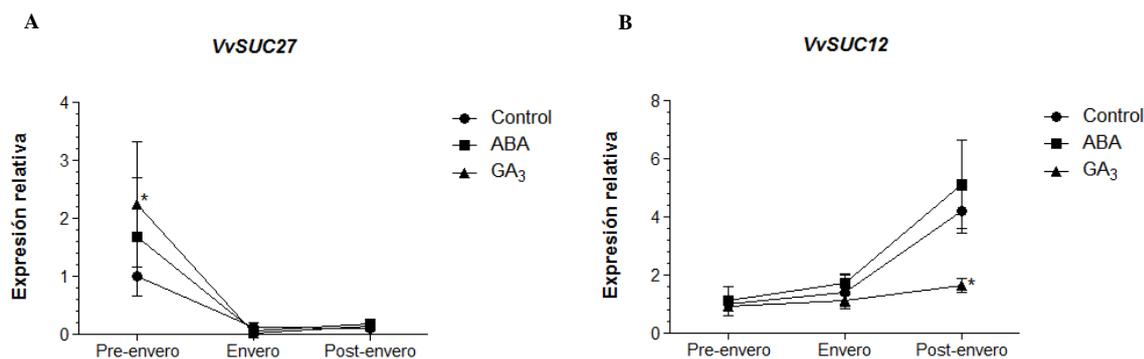


Figura 4.3. Efecto de ABA y GA₃ sobre la expresión de genes que codifican para transportadores de sacarosa medidas en bayas en pre-enero (30 DDA), enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-enero (130 DDA). Se muestran las expresiones relativas a lo largo del desarrollo de la baya de (A), *VvSUC27*; (B), *VvSUC12*. Los valores corresponden a medias de 4 repeticiones biológicas y tres técnicas \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada tratamiento y el control mediante la prueba de permutación ($p < 0,05$). Todos los valores fueron normalizados utilizando el gen endógeno *VvEF 1- α* y se utilizó la muestra control pre-enero como muestra de referencia.

La Figura 4.4 muestra la expresión relativa de dos genes que desdoblan sacarosa (invertasas), uno vacuolar (*VvGIN1*) y otro de pared celular (*VvcwINV*). Al igual que con los genes transportadores de sacarosa, estos genes presentan un patrón de expresión opuesto. La mayor transcripción de *VvGIN1* ocurrió en pre-enero, mientras que la mayor expresión de *VvcwINV* se observó en post-enero. Sólo el tratamiento GA₃ mostró diferencias significativas con respecto al tratamiento control en relación al gen *VvcwINV* en el estadio post-enero. El mismo presentó una sub-expresión de los transcritos.

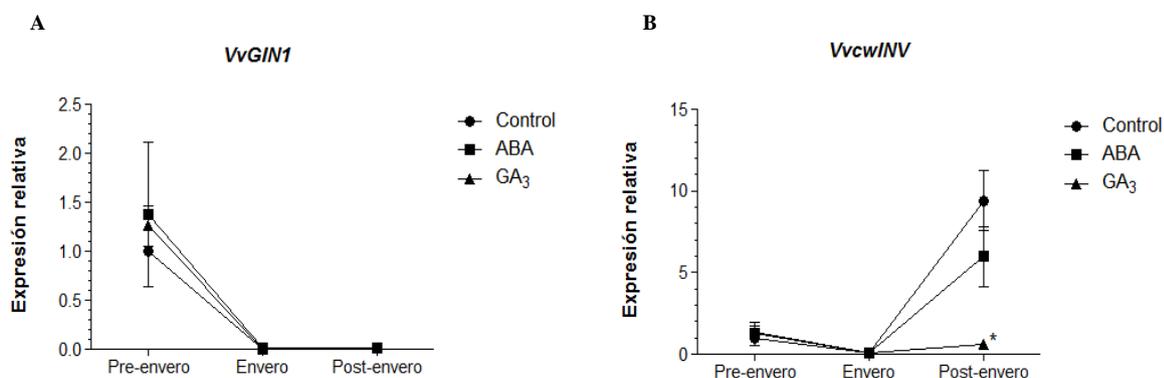


Figura 4.4. Efecto de ABA y GA₃ sobre la expresión de genes que codifican para invertasas medidas en bayas en pre-enero (30 DDA), enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃) y post-enero (130 DDA). Se muestran las expresiones relativas a lo largo del desarrollo de la baya de (A), *VvGIN1*; (B), *VvcwINV*. Los valores corresponden a medias de 4 repeticiones biológicas y tres técnicas \pm EE. Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada tratamiento y el control mediante la prueba de permutación ($p < 0,05$). Todos los valores fueron normalizados utilizando el gen endógeno *VvEF 1- α* y se utilizó la muestra control pre-enero como muestra de referencia.

Se realizó un gráfico de mapa de temperaturas (representación gráfica con colores de los niveles de expresión de cada gen estudiado) en cada momento fenológico de las bayas control para comparar las expresiones de cada gen en relación a otro. Se observó que en pre-envero, dentro de los genes transportadores de hexosas los más expresados fueron *VvHT1* y *VvHT3* y los menos expresados fueron *VvHT2*, *VvHT5* y *VvHT6*. En relación a los genes transportadores de sacarosa, el más expresado fue el *VvSUC27* y el menos expresado el *VvSUC12*. Por otro lado, la invertasa vacuolar *VvGIN1* fue la más expresada en relación a este grupo de genes (Figura 4.5).

En envero, los transportadores de hexosas más expresados fueron el *VvHT6* y el *VvHT2*, mientras que los menos expresados fueron el *VvHT1* y *VvHT3*. Con respecto a los transportadores de sacarosa, el más expresado fue el *VvSUC12*. En relación a los genes que desdoblan sacarosa, el más expresado fue el *VvGIN1* (Figura 4.5).

En post-envero, los genes *VvHT1* y *VvHT5* fueron los más expresados en relación a transportadores de hexosas. En contraposición de lo que ocurrió en pre-envero, el gen *VvSUC12* fue el transportador de sacarosa más abundante en post-envero. Del mismo modo, la invertasa de pared celular *VvcwINV* fue la más expresada en comparación con *VvGIN1* (Figura 4.5).

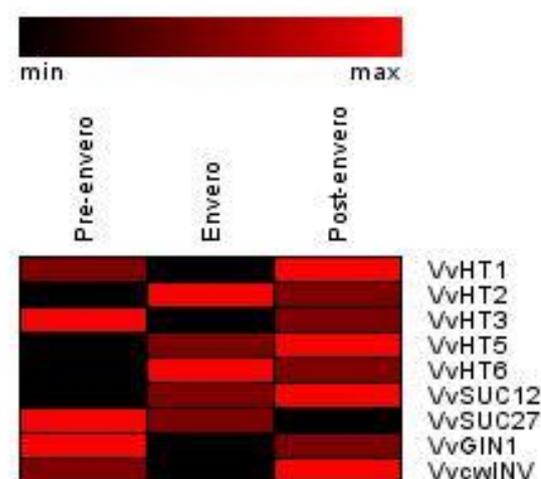


Figura 4.5. Mapa de temperatura en los tres estadios fenológicos de la baya control, pre-envero (30 DDA), envero (70 DDA) y post-envero (130 DDA). La escala de color representa el nivel de expresión de cada gen evaluado a lo largo del desarrollo de la baya. El color rojo indica alta expresión, mientras que el negro indica baja expresión.

4.4 Discusión

Como se explicó en el capítulo anterior, la fuerza que moviliza el flujo floemático desde los órganos fuentes hacia los órganos destinos está dada por la siguiente fórmula: $\Delta P = P_{\text{fuente}} - P_{\text{destino}}$. Se hipotetizó que un mayor incremento en la concentración de sacarosa en las hojas tratadas con las fitohormonas en envero sería la responsable del incremento de P_{fuente} , y por lo tanto de la carga floemática. En esta sección se discutirá la importancia de los transportadores de azúcares en la carga y descarga de fotoasimilados.

Si bien se cree que la carga floemática en las plantas de vid es pasiva, mediada por plasmodesmos, hay evidencias de que en hojas de plantas de vid existen transportadores de sacarosa y hexosas que estarían actuando activamente en la carga floemática, en forma paralela con la carga pasiva de fotoasimilados (Afoufa-Bastien et al. 2010, Hayes et al. 2010, Medici et al. 2014, Pastenes et al. 2014). Los resultados presentados en la presente tesis confirman lo encontrado por los autores citados anteriormente. Sin embargo, en este trabajo se observó una disminución general de la expresión relativa de los genes que codifican para los transportadores de sacarosa y hexosas en hojas adultas en el estadio fenológico de envero, tanto en el tratamiento ABA como en el tratamiento GA_3 . Los genes *VvHT3*, *VvHT5* y el gen *VvHT6*, presentaron una disminución de sus transcritos en los tratamientos con ambas fitohormonas. Sin embargo, esto no se correlacionó con lo encontrado por Hayes et al. (2010), en donde el gen *VvHT5* fue regulado positivamente con el agregado de ABA en hojas del cv. Chardonnay. Esta diferencia pudo deberse a que en el experimento llevado a cabo por Hayes et al. (2010) se utilizaron plantas desprovistas de racimos. Es decir, que los resultados pudieron haber variado, en relación a los presentados en esta tesis, debido a una modificación en la relación fuente: destino. Experimentos de hibridación *in situ* han mostrado que los transcritos del gen *VvHT1* son abundantes en la membrana de los elementos cribosos (floema) de hojas, peciolo y bayas (Vignault et al. 2005). Asimismo, aunque la savia floemática contenga mayoritariamente sacarosa, ínfimas cantidades de monosacáridos han sido detectados, y, por lo tanto, *VvHT1* podría participar en la recuperación de pequeñas fugas de hexosas del complejo de conducción, mejorando la eficiencia del transporte. Además, Çakir et al. (2003) identificaron un factor de transcripción en vid denominado *VvMSA* correspondiente a un miembro de la familia proteica ASR (del inglés, ABA-, stress-, and ripening-induced) que regula positivamente la transcripción del gen *VvHT1*. Por lo que la sobre expresión de *VvHT1* en hojas de vid tratadas con ABA pudo deberse a un incremento en los niveles de transcritos del gen *VvMSA*. Los bajos niveles de expresión de los genes *VvHT2* y *VvHT6* en hojas adultas de vid en comparación con la expresión de estos en bayas, reafirma la teoría de que dichos transportadores estarían más relacionados con la descarga floemática y acumulación de fotoasimilados en órganos destinos, que en la carga activa del floema de órganos fuentes. Por otro lado, los resultados presentados aquí sugieren una regulación negativa entre las fitohormonas ABA y GA_3 en relación a los genes *VvSUC12* y *VvSUC27* en hojas adultas en el estadio de envero. Por lo tanto, teniendo en cuenta los valores de expresión relativa de los genes que codifican para transportadores en hojas, se podría inferir que los mismos no jugarían un papel fundamental en la carga floemática y que, en *Vitis vinifera* cv. Malbec, la carga pasiva tendría un rol preponderante o mayoritario en el transporte de fotoasimilados. Sin embargo, la presencia y el nivel de expresión de algunos de estos genes hacen pensar que podrían tener cierta participación en algunos momentos específicos de la ontogenia de la planta, en determinadas circunstancias estresantes como sequía o en el transporte de azúcares intracelular, es decir desde organelas a citoplasma y viceversa. Para ello, es necesario dilucidar

la localización subcelular de los mismos como así también los niveles de sus proteínas. Al comparar los niveles de expresión de los genes *VvGIN1* y *VvcwINV* en hojas y en bayas, es factible decir que las invertasas se encuentran más asociadas a órganos destinos que a órganos fuentes. Esto es fácil de fundamentar ya que las bayas de vid acumulan grandes cantidades de hexosas en sus vacuolas a partir de envero. Asimismo, la sobre-expresión del gen *VvGIN1* en pre-envero cumple un rol esencial, ya que debe desdoblar la sacarosa para que tanto la glucosa como la fructosa sean utilizados como sustratos respirables para facilitar el crecimiento del órgano.

A partir de envero, las bayas de vid cambian el mecanismo de descarga del floema pasando de ser simplástico, mediado por plasmodesmos, a ser apoplástico, mediado por transportadores de azúcares (Zhang et al. 2006). Además, ha sido demostrado que a partir de éste momento fenológico la mayoría de la sacarosa descargada es desdoblada en glucosa y fructosa en la pared celular de las células del mesocarpo mediante la actividad de la enzima *VvcwINV*. Mientras que previo al envero (bayas verdes) la hidrólisis de la sacarosa es llevada a cabo en vacuola mediante las enzimas *VvGIN1* y *VvGIN2* (Zhang et al. 2006). De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente tesis, se confirma lo observado por Zhang et al. (2007) y otros investigadores (Davies y Robinson 1996, Sarry et al. 2004, Deluc et al. 2007, Hayes et al. 2007), ya que los niveles de expresión del gen *VvGIN1* es elevado en bayas de pre-envero (Figura 4.5), mientras que la acumulación de transcritos del gen *VvcwINV* es mayor en bayas de post-envero (Figura 4.5), demostrando el cambio del mecanismo de descarga floemático, pasando de simplástico a apoplástico. Luego de la hidrólisis de la sacarosa por parte de la enzima *VvcwINV*, los transportadores de hexosas comienzan a jugar un papel fundamental para el ingreso y acumulación de estos azúcares en las vacuolas de las células parenquimáticas del mesocarpo, reduciendo, de esta forma, la presión osmótica (Ψ_o) en el apoplasto. Como consecuencia, la presión de turgencia en la zona del floema correspondiente a la baya disminuye, ya que ha sido establecido que una caída de la Ψ_o conlleva una caída de la $P_{destino}$ (Keller 2010). De esta forma, mientras más activos se encuentren los transportadores de hexosas a partir del momento fenológico de envero, mayor será la fuerza con la que los frutos atraigan hacia sí los fotoasimilados y de esta forma la planta privilegiará tales destinos en lugar de otros. De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede afirmar lo observado por Hayes et al. (2007) ya que los valores de expresión del gen *VvHT3* en bayas del cv. Malbec fueron mayores en pre- y post-envero y menores durante envero. Sin embargo, a diferencia de lo reportado por Conde et al. (2006) se observó un incremento en la acumulación de transcritos del gen *VvHT1* tanto en pre-envero como en post-envero (Figura 4.5). Además, los patrones de expresión de los genes *VvHT2*, *VvHT6* (mayor en envero) y *VvHT5* (mayor en post-envero) en bayas de vid (Figura 4.5) fueron coincidentes con lo visto por otros autores tales como Hayes et al. (2007), Afoufa-Bastien et al. (2010) y Pastenes et al. (2014). Asimismo, la mayor expresión del gen *VvHT5* en bayas de vid tratadas con ABA pudo haberse debido a la presencia de dominios ABRE en la región promotora de dicho gen, que actúa regulando positivamente su transcripción cuando se haya en la célula la molécula de ABA (Hayes et al. 2010). Por su parte, la mayor expresión de los genes *VvHT2* y *VvHT6* de las bayas tratadas con ABA en envero sería una de las causas por la cual estas plantas mostraron un adelanto en la maduración. Mientras que el retraso en la maduración de las bayas tratadas con GA_3 pudo deberse a la menor expresión relativa de tales genes. Por otro lado, la mayor expresión relativa de los genes *VvHT2* y *VvHT3* de bayas tratadas con GA_3 en post-envero coincidió con el mayor contenido de glucosa y fructosa en comparación con los restantes tratamientos. De acuerdo a lo discutido anteriormente y a los niveles de expresión de

los genes *VvHT2*, *VvHT3* y *VvHT6* a lo largo del desarrollo de la baya, es que se postulan dichos transportadores como los de mayor importancia en la acumulación de hexosas en bayas de plantas del cv. Malbec.

En relación a los transportadores de sacarosa en bayas, la mayor expresión relativa del gen *VvSUC27* en bayas inmaduras (pre-envero) y la mayor expresión del gen *VvSUC12* en bayas maduras (post-envero) de plantas del cv. Malbec (Figura 4.5) coincide con los resultados obtenidos por Afoufa-Bastien et al. (2010) en plantas del cv. Chardonnay. En este caso, la menor expresión relativa de estos genes en el tratamiento con GA₃ no se correlacionó con los contenidos de sacarosa de sus bayas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en ésta sección, se puede aceptar parcialmente la hipótesis de trabajo IV. Es decir, el ABA y GA₃ incrementan la expresión de algunos genes que codifican para transportadores de hexosas en bayas del cv. Malbec como *VvHT2*, *VvHT3*, *VvHT5* y *VvHT6* aunque en distintos momentos fenológicos en relación a cada tratamiento. Sin embargo, la mayoría de los genes transportadores de azúcares en hojas del cv. Malbec tratadas con las fitohormonas presentaron una disminución en los niveles de expresión en comparación con el control.

Capítulo 5: Efecto regulador de ABA y GA₃ sobre el perfil de metabolitos secundarios en hojas, bayas y raíces de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec.

5.1 Introducción

Las plantas, son capaces de sintetizar una gran cantidad de compuestos orgánicos de los cuáles sólo una pequeña proporción tiene una participación directa en el crecimiento y desarrollo. El resto, son denominados, tradicionalmente, metabolitos secundarios. Mientras que los metabolitos primarios tales como azúcares, ácidos orgánicos, lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos, entre otros, se encuentran presentes en todas las plantas del reino vegetal, los metabolitos secundarios se hallan distribuidos diferencialmente entre los distintos grupos taxonómicos. Los metabolitos primarios, participan en la nutrición y en procesos metabólicos esenciales de la planta, mientras que los metabolitos secundarios, también denominados productos naturales, están involucrados en todos aquellos procesos de interacción entre la planta y el ambiente. Basado en la biosíntesis de los compuestos, los metabolitos secundarios pueden dividirse en tres grupos principales: polifenoles, terpenos y alcaloides (Croteau et al. 2000).

Los polifenoles pueden ser definidos como metabolitos secundarios aromáticos que poseen uno o más grupos hidroxilos enlazados covalentemente a un anillo benceno (Croteau et al. 2000). Dentro de sus funciones conocidas se encuentran: defensa contra herbivoría y patógenos, soporte mecánico (lignina), atrayente de polinizadores, disminución de daño por luz UV-B y reducción del crecimiento de plantas vecinas, entre otras (Taiz y Zeiger 1998). En vid, los compuestos fenólicos se dividen en flavonoides, aquellos que poseen la estructura de dos anillos bencenos unidos por 3 átomos de carbono en donde se encuentra el oxígeno como heteroátomo (C6-C3-C6), y no flavonoides, aquellos que poseen el anillo benceno unido a 3 o a un átomo de carbono (C6-C3 o C6-C1). Dentro de los flavonoides se encuentran las proantocianidinas (taninos), antocianinas y monómeros de flavan-3-oles (catequinas). Los taninos o proantocianidinas son polímeros de flavan-3-oles que le confieren astringencia a los vinos tintos y se encuentran mayoritariamente en las capas hipodérmicas del hollejo, en las semillas y en el pedicelo de las bayas de vid. Pueden variar en tamaño encontrándose moléculas formadas por dos, tres y hasta más de 30 subunidades (Adams 2006, Kennedy et al. 2006). Las antocianinas, por su capacidad de absorber luz en el rango del espectro visible, son las responsables del color rojo en los vinos tintos y se encuentran mayoritariamente en el hollejo de las bayas de vid. Las antocianinas o antocianos son antocianidinas enlazadas covalentemente con una o más moléculas de azúcares, generalmente glucosa. Asimismo, las antocianinas pueden estar esterificadas con el ácido acético o cumárico y presentar metilaciones en alguno de los hidroxilos (Adams 2006). Las estructuras de los antocianos más comunes en las bayas y en el vino fueron determinadas por Ribéreau-Gayon (1959). En este sentido, la malvidina-3-glucósido, junto con sus formas acetiladas, es el antociano más abundante. Por otro lado, las catequinas están asociadas con el amargor y también con la astringencia de los vinos. Siendo las catequinas más abundantes en bayas y vinos la (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequin-3-galato (Su y Singleton 1969). Los compuestos fenólicos no flavonoides (C6-C3 o C6-C1), a excepción de los ácidos hidroxicinámicos, se encuentran en muy bajas concentraciones en las bayas y en el vino (Kennedy et al. 2006). Los hidroxicinamatos, como el ácido coumárico, son los polifenoles solubles más abundantes en las bayas de vid luego de los taninos y los antocianos (Lima et al. 2004).

La biosíntesis de los polifenoles solubles comienza con los precursores fenilalanina y tirosina, obtenidos en la ruta del ácido shikímico. Asimismo, estos compuestos se obtienen a partir de la eritrosa-4-fosfato (obtenida de la ruta de las pentosas fosfato) y el fosfoenolpiruvato (obtenido de la glicólisis). La primer enzima interviniente en la formación de los polifenoles es la fenilalanina amonio liasa (PAL), que cataliza la reacción de desaminación para la formación de ácido cinámico, en el caso de utilizar a la fenilalanina como sustrato, o ácido *p*-cumárico en el caso de utilizar a la tirosina como sustrato. Este último compuesto puede seguir una serie de transformaciones resultando en la formación de compuestos fenólicos simples como ácidos fenólicos y precursores de la lignina. La incorporación de 3 moléculas de malonil-CoA, producida mediante la vía acetato, a la molécula 4-cumaroil-CoA, producto obtenido a partir del ácido *p*-cumárico, da origen a los flavonoides o estilbenos, dependiendo de la actividad de la enzima chalcona sintasa (CHS) o estilbeno sintasa (ES), respectivamente (Dias 2003). Por otro lado, además de los efectos positivos que los polifenoles producen en las plantas, el consumo de antocianinas y otros polifenoles en la dieta, trae aparejado beneficios sobre la salud del hombre. En este sentido, por su carácter de poderoso antioxidante, estos compuestos tienen un efecto protector contra enfermedades coronarias y ciertos tipos de cánceres. Asimismo, se sabe que los antocianos de las bayas de vid y del vino tienen un mayor poder antioxidante por absorberse más rápidamente y ser más estables en el organismo (Bitsch et al. 2004).

Los terpenos presentan la mayor variedad de compuestos dentro de los metabolitos secundarios (aproximadamente 25000 compuestos, Croteau et al. 2000). Todos los terpenos son derivados de la molécula de 5 átomos de carbono denominado isopentano y se clasifican en hemi- (C5), mono- (C10), sesqui- (C15), di- (C20), tri- (C30) y tetraterpenos (C40) dependiendo del número de átomo de carbonos que posean (Croteau et al. 2000). En este sentido, la síntesis de los terpenos comienza con el precursor isopentenil difosfato o su isómero dimetilalil difosfato. Asimismo, en plantas superiores dos rutas metabólicas actúan independientemente para la formación de éstas unidades de 5 átomos de carbono. La primera se denomina ruta del ácido mevalónico (MEV) y ocurre en el citosol, mientras que la segunda se denomina vía del metileritritol fosfato (MEP) y ocurre en plastidios (Lichtenthaler et al. 1997). La ruta MEV provee los precursores para la formación de sesquiterpenos y esteroides, mientras que la ruta MEP provee los precursores para la síntesis de monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos (McGarvey y Croteau 1995, Hampel et al. 2005, Tholl 2006). En un primer momento, las unidades de C5 son condensadas mediante prenil transferasas para dar como producto al geranil difosfato (C10), posteriormente se adiciona secuencialmente dos unidades de isopreno para formar, en un primer momento, el farnesil difosfato (C15) y luego el geranilgeranil difosfato (C20). Estos prenil difosfatos, pueden seguir transformaciones de ciclización y oxidación para dar lugar a la formación de los distintos mono-, sesqui- y diterpenos (Dudareva et al. 2004). Estos pasos son catalizados por las enzimas terpeno sintasas (TPS) que comprenden una gran familia enzimática, que han sido estudiadas en muchas especies (Facchini y Chappell 1992, Steele et al. 1998, Wise et al. 1998, Degenhardt et al. 2009), inclusive en vid (Lücker et al. 2004, Martin et al. 2010). Por otro lado, la síntesis de los triterpenos (C30) se lleva a cabo por condensación de dos unidades de farnesil difosfato (C15), mientras que la formación de tetraterpenos (C40) se realiza mediante la unión de dos moléculas de geranilgeranil difosfato (C20), por la acción de las enzimas prenil transferasas (Croteau et al. 2000).

La función que cumplen los terpenos en los tejidos vegetales puede estar asociada a una respuesta de defensa contra patógenos (muchos poseen actividad antimicrobiana) y ataque de herbívoros, a la reproducción mediando la atracción de polinizadores, así como a una respuesta de defensa frente a estrés abiótico (Grassmann et al. 2002, Nagegowda 2010, Gil et al. 2012, Escoriza et al. 2013). Existen estudios que demuestran que tanto frente estrés biótico como abiótico, la concentración de metabolitos secundarios terpénicos aumenta con respecto a plantas no estresadas y, asociado, se observa un aumento en la concentración de ABA (Beckett et al. 2012, Gil et al. 2012, Escoriza et al. 2013).

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Material vegetal y condiciones experimentales

Tanto las plantas de vid como las condiciones experimentales utilizadas en este capítulo se corresponden con las del capítulo 2.

5.2.2 Extracción y cuantificación de aminoácidos libres

La extracción de los aminoácidos libres se realizó a partir de hojas adultas, hollejo de bayas y de la raíz de 4 plantas de vid por tratamiento, en el momento fenológico de envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los hollejos se obtuvieron pelando la baya con mucho cuidado utilizando pinza histológica. Una vez extraído, se eliminó la máxima cantidad de pulpa que se encontraba adherida a la superficie interna del tejido mediante papel de filtro. En los tres casos se pesó una cantidad de 50 mg de tejido y se homogenizó con mortero y pilón utilizando 1 mL de HCl 0,1 M. La mezcla se trasvasó a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se agregó 5 µL de una solución de 1000 mg L⁻¹ de metionina sulfone, como estándar interno. Se agitó mediante vortex durante 10 min y se centrifugó a temperatura ambiente durante 3 min a 13200 rpm. Se tomó el sobrenadante y se lo colocó en un nuevo tubo eppendorf. Luego, se hizo una extracción en fase sólida utilizando una columna de SPE (Extract Clean SCX 100 mg/1,5 mL), pre-acondicionada. Para ello, se pasó un volumen de 1 mL de HCl 0,1 M y 3 mL de agua mΩ con ayuda de bomba de vacío. Luego, se hizo pasar el sobrenadante obtenido anteriormente y se lavó la columna con 2 mL de metanol:agua, 80:20. Posteriormente, se eluyeron los aminoácidos con 250 µL de NH₄OH 8 M:metanol, 1:1, recolectando el líquido en un vial de 1,5 mL. Una vez obtenidos y purificados los aminoácidos libres, se derivatizaron con 10 µL de piridina pura y 20 µL de etilclorofornato puro. La mezcla se dejó reaccionar durante 1 min. Luego, se agregó 90 µL de cloroformo y 90 µL de NaHCO₃ 50 mM y se agitó en vortex durante 1 min. Finalmente, se tomaron 55 µL de la fase inferior y se lo colocó en otro vial para inyectar 2 µL al cromatógrafo gaseoso asociado a un espectrómetro de masa (GC-MS, Clarus 500, PerkinElmer, Shelton, CT, USA). La columna utilizada fue Perkin-Elmer Elite-5MS (30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de película) en donde la elución se realizó con He cuyo flujo fue de 1 mL min⁻¹. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: temperatura inicial 70 °C por 1 min, seguido de un incremento de 10 °C min⁻¹ hasta 280 °C y se mantuvo esta temperatura durante 10 min. El potencial de ionización del espectrómetro de masa fue de 70 eV y se escaneó un rango de 50-360 unidades de masa. Una vez obtenidos los cromatogramas, los compuestos fueron identificados comparando los tiempos de retención en GC y los espectros de masa completos de los correspondientes estándares previamente inyectados. Luego, la cuantificación de cada compuesto identificado se realizó comparando el área del pico del compuesto con el área del pico de la concentración conocida de metionina sulfone.

5.2.3 Extracción y cuantificación de antocianos y polifenoles de bajo peso molecular (PBPM)

Los antocianos y los PBPM fueron extraídos de hojas adultas, hollejo de bayas y raíz de 4 plantas por tratamiento, en el momento fenológico de envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃), utilizando metodologías publicadas con algunas modificaciones (De Nisco et al. 2013, Xu et al. 2011, Nicoué et al. 2014). Dichos compuestos fenólicos, fueron extraídos de 0,5 g de peso fresco de hollejos y 1 g de peso fresco de hojas y raíces mediante mortero y pilón utilizando 5 mL de metanol acidificado al 1 % con HCl. La mezcla se trasvasó a tubos de vidrio y fueron sonicados durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugaron durante 10 min a 3500 rpm y el sobrenadante se lo colocó en tubos Falcon de 15 mL. El procedimiento fue repetido 2 veces para hojas y raíces, combinado los sobrenadantes en un mismo tubo. Posteriormente, los extractos fueron enrasados en 10 mL con el solvente de extracción. Finalmente, una alícuota de 1 mL del extracto fue evaporado hasta sequedad mediante N₂, el residuo fue reconstituído con el solvente de la fase móvil inicial, filtrado a través de un filtro de 0,45 µm y, luego, analizado mediante un cromatógrafo líquido asociado a un detector de múltiples longitudes de onda (HPLC-MWD). Este procedimiento fue seguido por la determinación directa de antocianinas en hollejos de bayas y por la determinación directa de PBPM de hojas y raíces. Para la cuantificación de PBPM en hollejos de bayas y antocianinas en hojas y raíces, fue necesaria una preparación adicional de las muestras.

5.2.3.1 Purificación de antocianinas y PBPM

Para la determinación de antocianinas en hojas, fue necesaria una preparación adicional de la muestra debido a la baja concentración de estos compuestos en dicho tejido. Para ello, una alícuota de 3 mL de los extractos obtenidos fue evaporado hasta sequedad mediante N₂ y disuelto en 3 mL de agua acidificada al 0,1 % con ácido fórmico (AF). Las antocianinas fueron concentradas y purificadas mediante una extracción en fase sólida (SPE). En este sentido, los extractos re-disueltos fueron cargados en una columna de SPE (Sep-pak[®] C₁₈, 500 mg) que, previamente, fue acondicionado con metanol acidificado al 0,1 % con AF y agua acidificada al 0,1 % con AF. Las antocianinas quedaron adsorbidas sobre la columna, mientras que los azúcares, ácidos orgánicos y otros compuestos solubles fueron removidos con la solución de agua acidificada al 0,1 % con AF. Posteriormente, las antocianinas fueron eluidas con 3 mL de metanol acidificado al 0,1 % con AF. La fracción de metanol acidificado fue evaporado hasta sequedad, el residuo fue re-disuelto en el solvente de la fase móvil inicial y analizado mediante HPLC-MWD.

Por otro lado, para la determinación de los PBPM de hollejos de bayas, una alícuota de 6 mL de los extractos obtenidos fue evaporado hasta sequedad y re-disuelto en 5 mL de agua. Los PBPM fueron extraídos de acuerdo a la metodología publicada por Fontana y Bottini (2014). Para ello, los extractos re-suspendidos fueron extraídos con 2,5 mL de acetonitrilo (MeCN) acidificado al 2,5 % con AF. Se agregó 1,5 g de NaCl y 4 g de MgSO₄, se agitó en vortex durante 1 min y se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm. Luego, una alícuota de 1 mL del sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo conteniendo 150 mg de MgSO₄, 100 mg de PSA (mezcla de aminas primarias y secundarias) y 100 mg de C₁₈. La mezcla se agitó en vortex durante 1 min y se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm. Finalmente, una alícuota del

sobrenadante fue evaporado hasta sequedad con N₂, el residuo fue re-disuelto en el solvente de la fase móvil inicial y, luego, analizado por HPLC-MWD.

5.2.3.2 Análisis mediante HPLC-MWD

La separación y cuantificación por cromatografía líquida fue llevada a cabo mediante el equipo Dionex Ultimate 3000 HPLC-MWD (Dionex Softron GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc., Germering, Germany) y una columna C₁₈ de fase reversa Kinetex (100 mm x 3 mm, 2,6 μm) Phenomenex (Torrance, CA, USA). Para el análisis de los PBPM, las fases móviles utilizadas fueron agua ultrapura con 0,1 % de AF (A) y MeCN (B). Los analitos fueron separados siguiendo el siguiente gradiente: 0-2,7 min, 5 % B; 2,7-11 min, 30 % B; 11-14 min, 95 % B; 14-15,5 min, 95 % B; 15,5-17 min, 5 % B; 17-20, 5 % B. El flujo de la fase móvil fue fijado a 0,8 mL min⁻¹. La temperatura de la columna fue de 35 °C y el volumen de inyección fue de 5 μL. Las muestras fueron cuantificadas usando una calibración externa con estándares puros. Para todos los PBPM estudiados, los rangos lineales entre 2 y 1000 μg mL⁻¹ tuvieron un coeficiente de determinación (R²) mayor que 0,998.

Para el análisis de antocianinas, la fase móvil consistió en una mezcla de agua ultrapura: AF: MeCN, 87:10:3, v/v/v (A) y una mezcla de agua ultrapura: AF: MeCN, 40:10:50, v/v/v (B) usando el siguiente gradiente: 0 min, 10% B; 0-6 min, 25% B; 6-10 min, 31% B; 10-11min, 40% B; 11-14 min, 50% B; 14-15 min, 100% B; 15-17 min, 10% B; 17-21 min, 10% B. El flujo de la fase móvil fue de 1 mL min⁻¹, la temperatura de la columna fue de 25 °C y el volumen de inyección fue de 5 μL. Las cuantificaciones fueron llevadas a cabo mediante la medición del área bajo la curva a 520 nm y el contenido de antocianina fue expresado como malvidina-3-glucósido, usando una curva de calibración estándar externa (1-250 μg mL⁻¹, R²=0.9984).

5.2.4 Extracción y cuantificación de mono-, sesqui- y triterpenos

La extracción de mono-, sesqui- y triterpenos se realizó a partir de hojas adultas, hollejo de bayas y de la raíz de 4 plantas de vid por tratamiento, en el momento fenológico de envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). En el caso de hojas y hollejos, se pesó una cantidad de 100 mg de tejido fresco y se maceró con mortero y pilón utilizando 1 mL de metanol y 1,5 mL de diclorometano. En el caso de las raíces, se partió de 1 g de tejido fresco y se maceró con 1,5 mL de metanol: agua, 80: 20, v/v y 2 mL de diclorometano. Una vez homogenizado, la mezcla se trasvasó a tubos de vidrio con tapa a rosca, se agitó en vortex y se guardó en heladera a 4 °C toda la noche. Luego, la mezcla se colocó en tubos eppendorf de 1,5 mL y se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm. El sobrenadante fue colocado en un tubo de vidrio con tapa a rosca observándose dos fases bien definidas (fase diclorometano y fase metanol); la fase metanol fue acidificada al 0,2 % con AF. Se agitó con vortex y se dejó en heladera a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se colocó en un inserto 100 μL de la fase diclorometano y se le adicionó 100 ng de *n*-hexadecano como estándar interno. Se inyectó, en modo split-splitless, 2 μL de la muestra en el GC-MS. Se utilizó una columna Perkin-Elmer Elite-5MS (30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de película) en donde la elución se realizó con He cuyo flujo fue de 0,7 mL min⁻¹. Para la determinación

de mono- y sesquiterpenos, el programa de temperatura del horno fue el siguiente: temperatura inicial 45 °C por 1 min, seguido de un incremento de 2 °C min⁻¹ hasta 130 °C, luego un incremento de 20 °C min⁻¹ hasta alcanzar 250 °C y se mantuvo en esta temperatura durante 10 min. En el caso de la determinación de triterpenos, el programa fue el siguiente: temperatura inicial 60 °C por 1 min, seguido de un incremento de 10 °C min⁻¹ hasta 280 °C y se mantuvo en esta temperatura durante 22 min. El potencial de ionización del espectrómetro de masa fue de 70 eV y se escaneó un rango de 40-500 unidades de masa. Una vez obtenidos los cromatogramas, los compuestos fueron identificados comparando los tiempos de retención en GC y los espectros de masa completos de los correspondientes estándares previamente inyectados y/o espectros de la librería NIST (Gil et al. 2012). Luego, la cuantificación de cada compuesto identificado se realizó comparando el área del pico del compuesto con el área del pico de la concentración conocida de *n*-hexadecano.

5.2.5 Análisis de datos

Para analizar estadísticamente los datos se realizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y posterior prueba de comparación de medias utilizando el estadígrafo LSD de Fisher. Se fijó un nivel de significancia de $p < 0,05$ para diferenciar entre medias utilizando el programa InfoStat (<http://sites.google.com/site/fgstatistics>).

5.3 Resultados

5.3.1 Las aplicaciones con ABA y GA₃ modifican los contenidos de aminoácidos libres en hojas de plantas de vid

Como se puede observar en la Figura 5.1, se pudieron identificar 13 aminoácidos libres en las hojas de plantas de vid. Los tratamientos con ABA y GA₃ disminuyeron los contenidos de los aminoácidos alifáticos neutros (L-valina, L-leucina y L-isoleucina), los aminoácidos aromáticos (L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptofano) y aminoácidos básicos (L-lisina). Por otro lado, las aplicaciones con ABA incrementaron los contenidos de los aminoácidos ácidos (L-asparagina, L-ácido glutámico y L-ácido aspártico) y del aminoácido L-prolina. De acuerdo a la Figura 5.2, los aminoácidos mayoritarios en los tres tratamientos son el L-ácido glutámico y L-ácido aspártico. Las plantas tratadas con ABA y GA₃ presentaron una disminución de las concentraciones relativas de ciertos aminoácidos como L-fenilalanina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina y L-lisina comparados con el control.

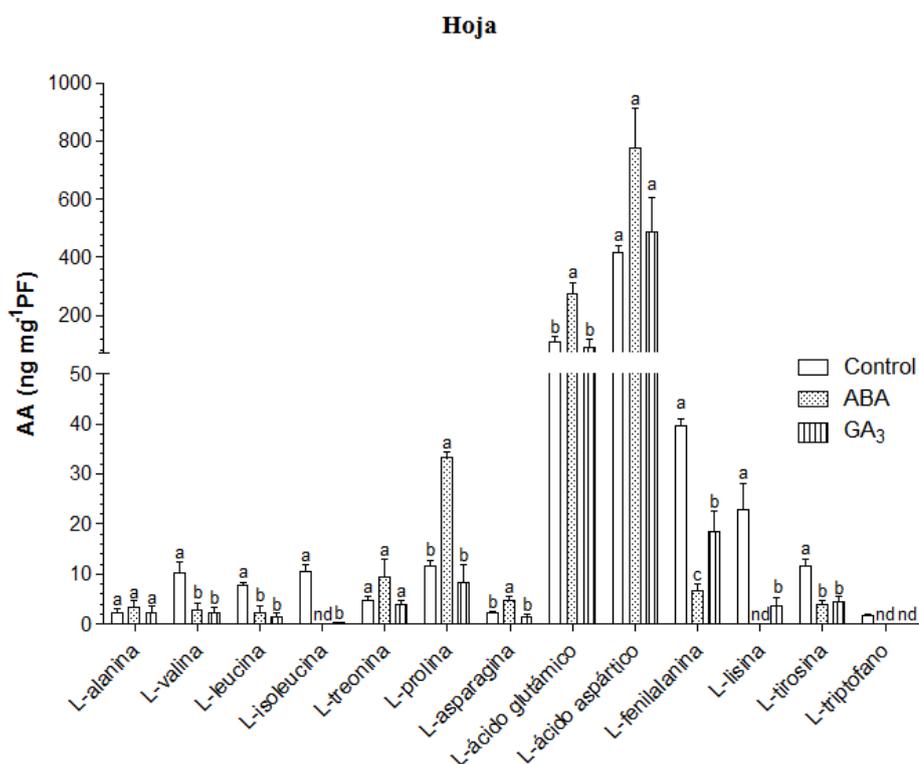


Figura 5.1. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de aminoácidos libres (AA, ng mg⁻¹ PF) medida en hojas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). nd: no detectado.

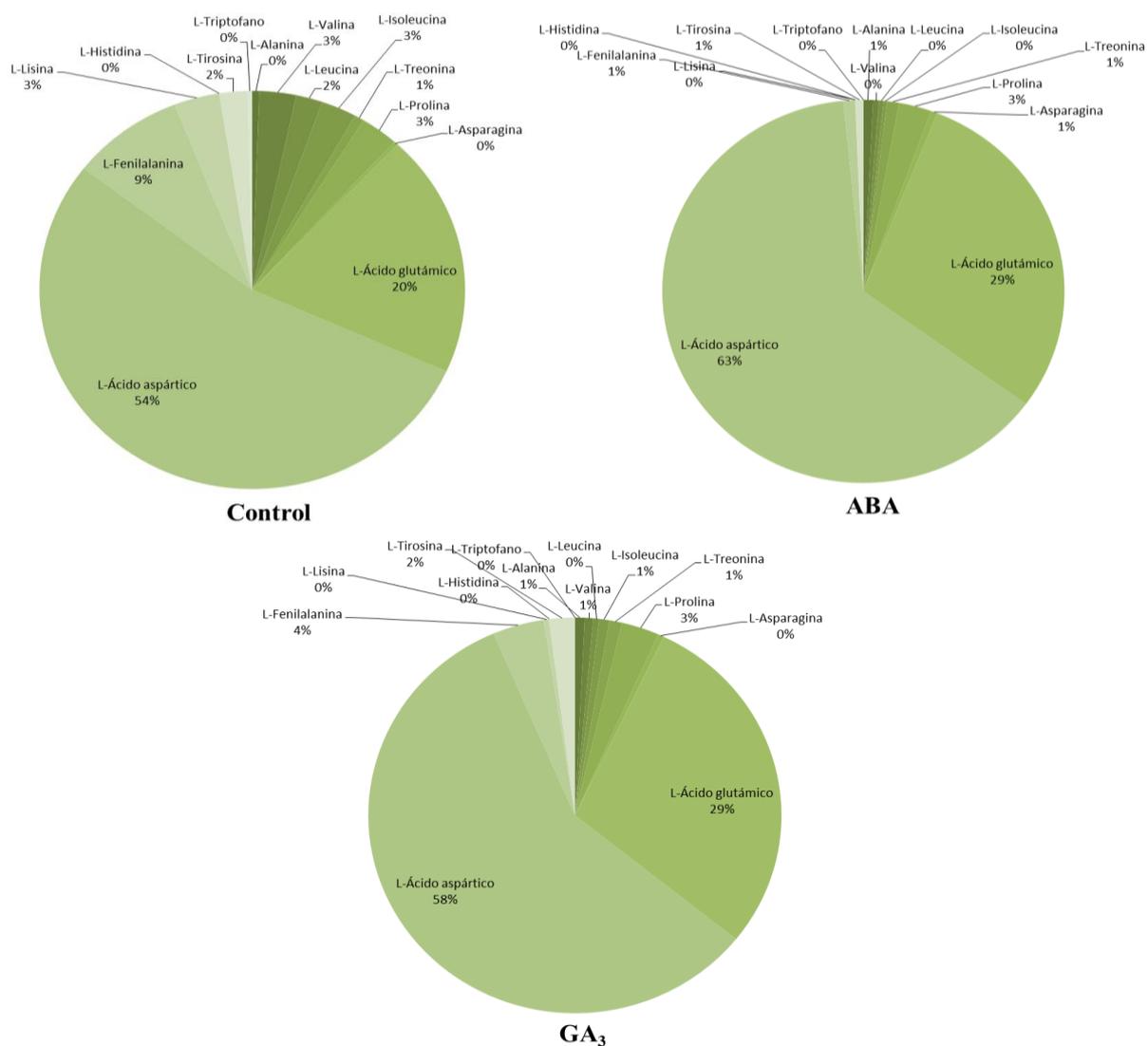


Figura 5.2. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de aminoácidos libres (expresada en %) en hojas de plantas de vid en invierno (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃).

5.3.2 Las aplicaciones con ABA y GA₃ modifican los contenidos de aminoácidos libres en bayas de plantas de vid

A diferencia de lo observado en hojas de plantas de vid, en hollejos de bayas se pudieron identificar una mayor cantidad (18) de aminoácidos libres (Figura 5.3). En este caso, el

tratamiento con GA₃ provocó un incremento de la concentración de la mayoría de los aminoácidos, tanto alifáticos neutros (L-alanina, L-valina, L-leucina y L-isoleucina), aromáticos (L-tirosina), ácidos (L-asparagina, L-ácido glutámico y L-ácido aspártico), azufrados (L-metionina) como de L-prolina. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los aminoácidos identificados entre los tratamientos ABA y control. De acuerdo a la concentración relativa (Figura 5.4), los aminoácidos mayoritarios en los tres tratamientos son el L-ácido aspártico y la L-prolina. Las plantas tratadas con ABA presentaron una notoria disminución relativa del aminoácido L-prolina (18 %) comparado con los tratamientos GA₃ (34 %) y control (35 %). Asimismo, el ABA, incrementó la concentración relativa de otros aminoácidos minoritarios en hollejo como el L-ácido glutámico, L-GABA (γ -amino butírico), L-alanina, L-fenilalanina y la L-histidina en comparación con los restantes tratamientos.

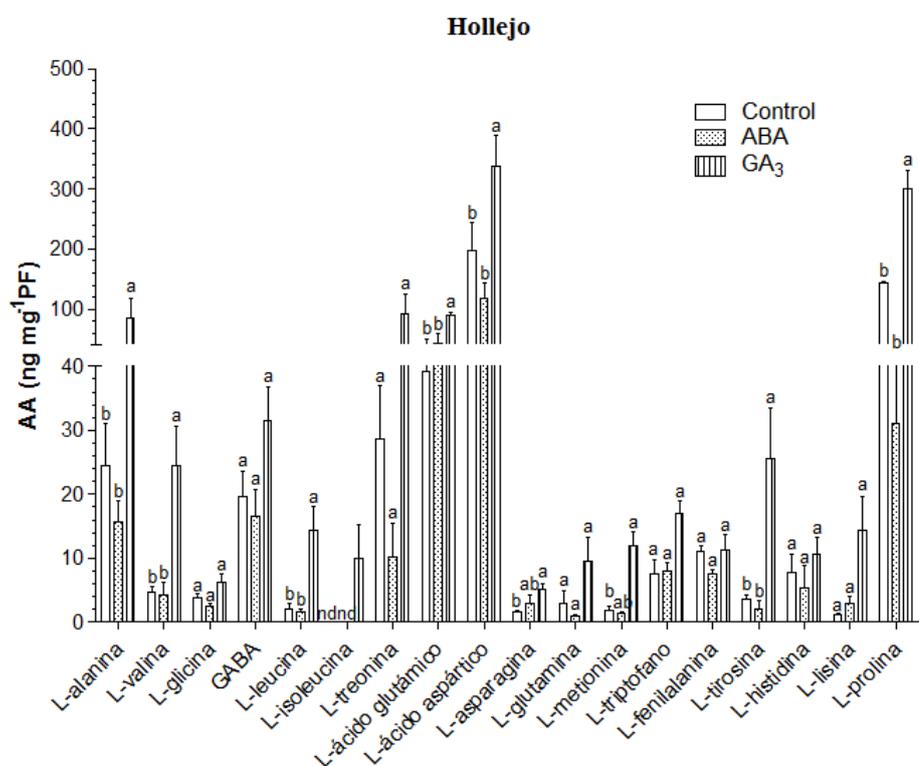


Figura 5.3. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de aminoácidos libres (AA, ng mg⁻¹ PF) medida en hollejos de bayas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado.

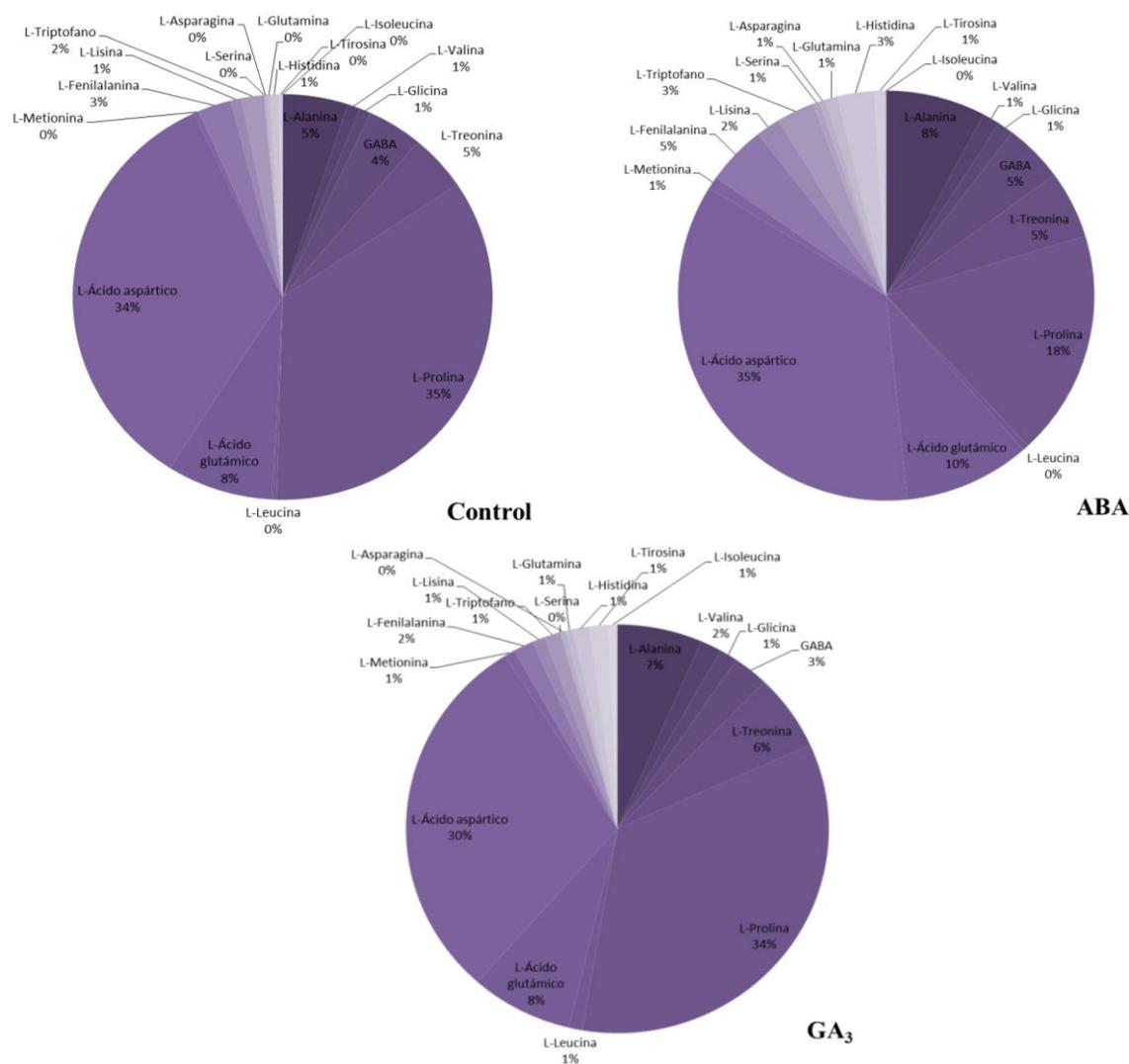


Figura 5.4. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de aminoácidos libres (expresada en %) en hollejos de bayas de plantas de vid en invierno (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃).

5.3.3 Las aplicaciones con ABA y GA₃ modifican los contenidos de aminoácidos libres en raíces de plantas de vid

En raíces de plantas de vid se pudieron identificar solamente 11 aminoácidos libres (Figura 5.5). En este caso, los tratamientos con GA₃ y ABA provocaron una disminución drástica en la concentración de todos los aminoácidos identificados, a excepción del L-ácido glutámico que no presentó diferencias significativas entre las plantas tratadas con las fitohormonas y las plantas control. De acuerdo a la concentración relativa (Figura 5.6), los aminoácidos mayoritarios en los tres tratamientos son el L-ácido glutámico, L-ácido aspártico y la L-alanina. Sin embargo, las plantas tratadas con GA₃ presentaron concentraciones relativas semejantes de los aminoácidos L-ácido glutámico (24 %), L-ácido aspártico (30 %) y L-alanina (22 %), en comparación con los tratamientos control y ABA en donde el aminoácido con mayor concentración relativa fue el L-ácido aspártico (50 %). Por otro lado, el tratamiento

ABA mostró mayores concentraciones relativas de ciertos aminoácidos como la L-fenilalanina y el L-ácido glutámico en comparación con el control. Asimismo, las plantas tratadas con ABA presentaron menores concentraciones relativas de los aminoácidos L-alanina, L-valina y L-isoleucina en comparación con el control.

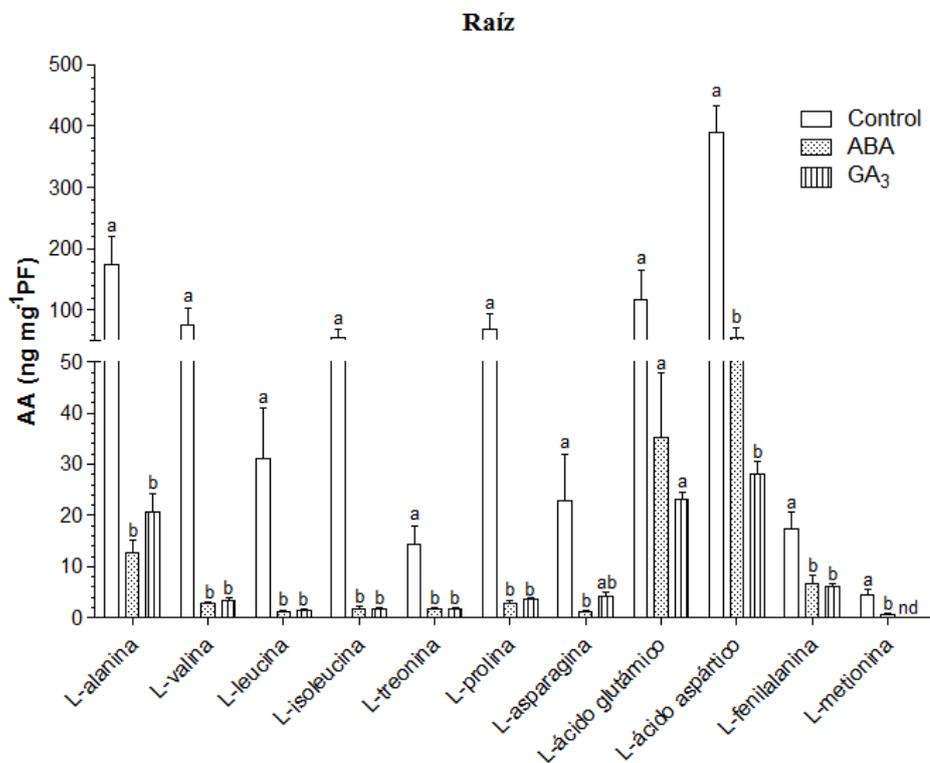


Figura 5.5. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de aminoácidos libres (AA, ng mg⁻¹ PF) medida en raíces de plantas de vid en invierno (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). nd: no detectado

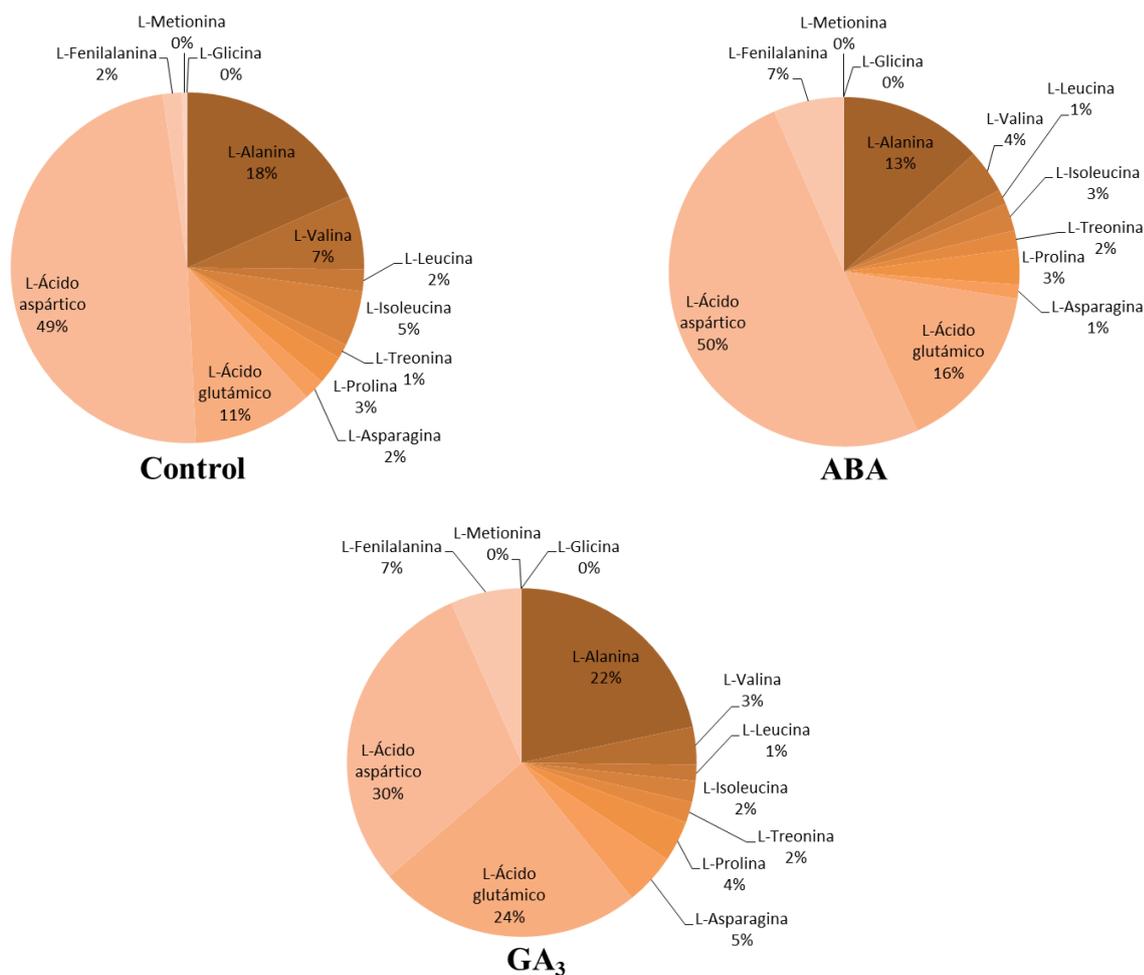


Figura 5.6. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de aminoácidos libres (expresada en %) en raíces de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃).

5.3.4 Las aplicaciones con ABA y GA₃ modifican los contenidos de antocianos en bayas de plantas de vid

En la Figura 5.7 se puede observar el contenido de los distintos antocianos identificados en hollejos de bayas de plantas de vid. Se identificaron las antocianinas delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, tanto en sus formas glucosilada, acetilada como p-cumarilada. Las aplicaciones con GA₃ provocaron, en 8 de las 15 antocianinas identificadas, una disminución de sus contenidos en comparación con los tratamientos ABA y control, aún cuando las bayas de este tratamiento fueron cosechadas 5 días más tarde que las de los controles. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de antocianos entre los tratamientos ABA y control. Sin embargo, se tiene que tener en cuenta que las bayas tratadas con ABA se cosecharon una semana antes que las controles, por lo que dicha fitohormona, estimuló la síntesis de estos metabolitos secundarios. En los tres tratamientos se observó una mayor abundancia de las antocianinas glucosiladas, seguida por las p-cumariladas y por último las acetiladas. Dentro de las glucosiladas, el antociano de

mayor abundancia fue la malvidina-3-glucósido (Figura 5.8). En relación a las concentraciones relativas de los distintos compuestos (Figura 5.8), no se observaron diferencias entre los tratamientos ABA y control; mientras que el tratamiento GA₃ incrementó la concentración relativa de la malvidina-3-glucósido y de la malvidina-3-p-cumarilada en comparación con el control. Asimismo, dicho tratamiento disminuyó las concentraciones relativas de los antocianos petunidina-3-glucósido y delfinidina-3-glucósido en comparación con el control.

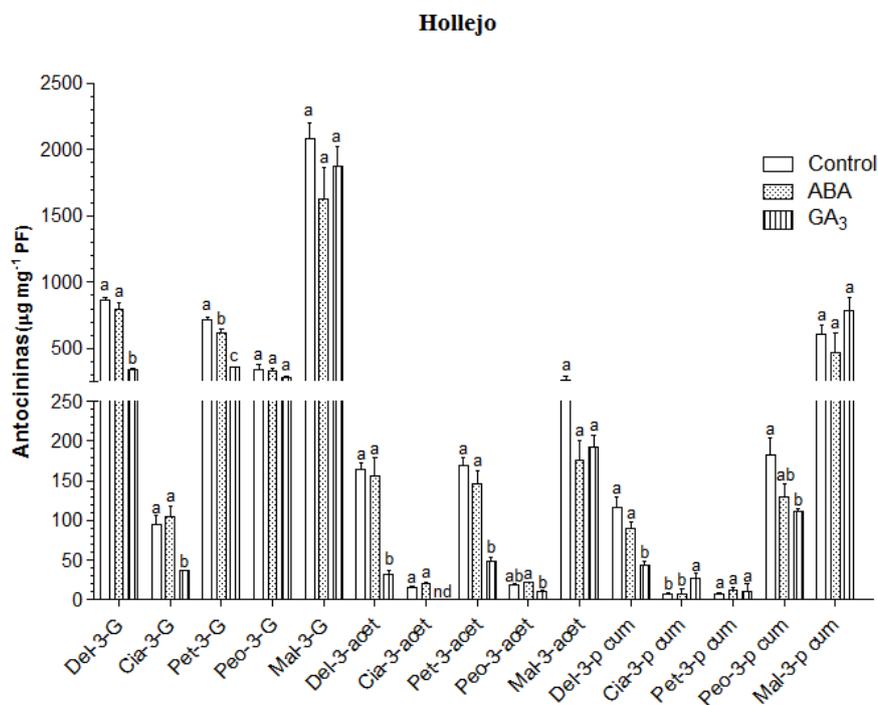


Figura 5.7. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de antocianos ($\mu\text{g mg}^{-1}$ PF) medidos en hollejos de bayas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado; Del-3-G: Delfinidina-3-Glucósido; Cia-3-G: Cianidina-3-Glucósido; Pet-3-G: Petunidina-3-Glucósido; Peo-3-G: Peonidina-3-Glucósido; Mal-3-G: Malvidina-3-Glucósido; Del-3-acet: Delfinidina-3-acetilada; Cia-3-acet: Cianidina-3-acetilada; Pet-3-acet: Petunidina-3-acetilada; Peo-3-acet: Peonidina-3-acetilada; Mal-3-acet: Malvidina-3-acetilada; Del-3-p cum: Delfinidina-3-p cumarilada; Cia-3-p cum: Cianidina-3-p cumarilada; Pet-3-p cum: Petunidina-3-p cumarilada; Peo-3-p cum: Peonidina-3-p cumarilada; Mal-3-p cum: Malvidina-3-p cumarilada.

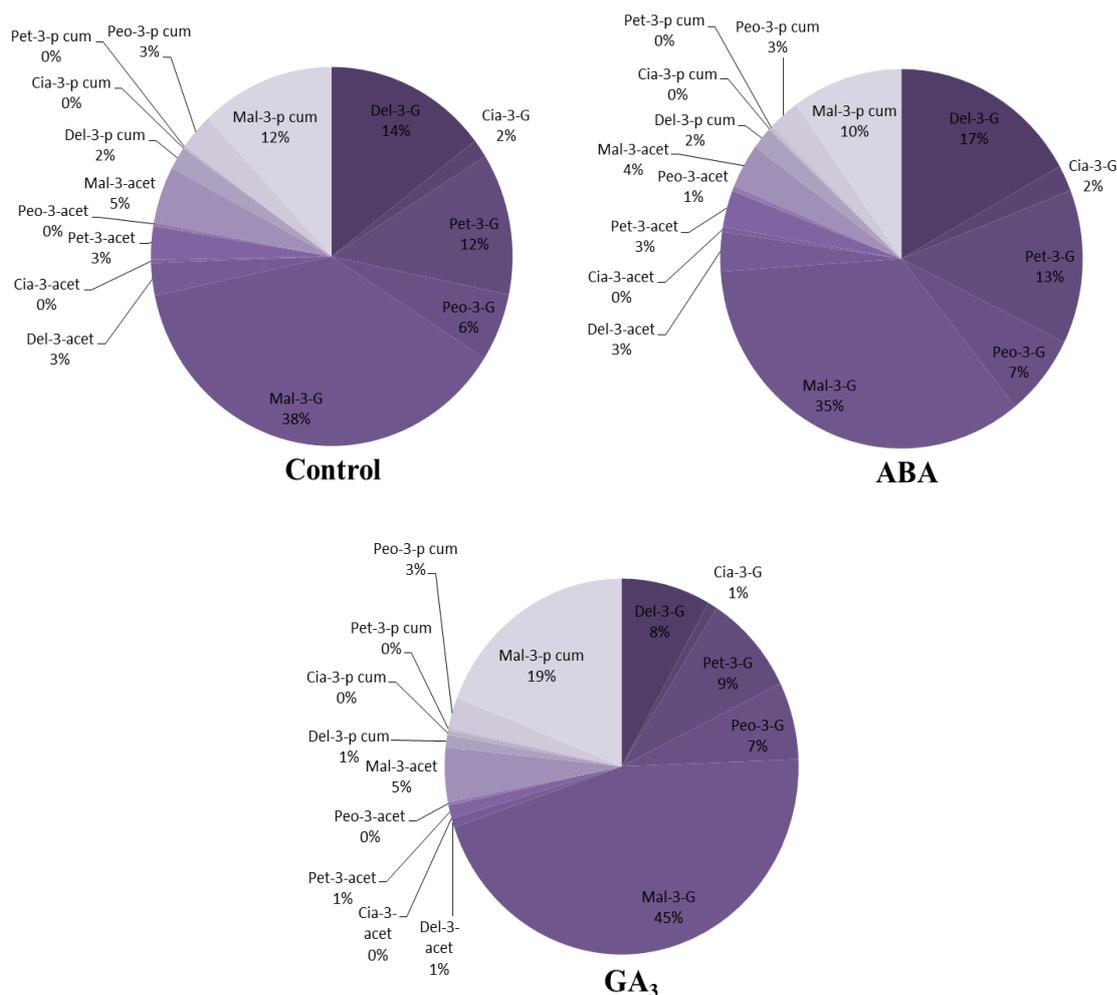


Figura 5.8. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de antocianos (expresada en %) en hollejos de bayas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Del-3-G: Delfinidina-3-Glucósido; Cia-3-G: Cianidina-3-Glucósido; Pet-3-G: Petunidina-3-Glucósido; Peo-3-G: Peonidina-3-Glucósido; Mal-3-G: Malvidina-3-Glucósido; Del-3-acet: Delfinidina-3-acetilada; Cia-3-acet: Cianidina-3-acetilada; Pet-3-acet: Petunidina-3-acetilada; Peo-3-acet: Peonidina-3-acetilada; Mal-3-acet: Malvidina-3-acetilada; Del-3-p cum: Delfinidina-3-p cumarilada; Cia-3-p cum: Cianidina-3-p cumarilada; Pet-3-p cum: Petunidina-3-p cumarilada; Peo-3-p cum: Peonidina-3-p cumarilada; Mal-3-p cum: Malvidina-3-p cumarilada.

5.3.5 Las aplicaciones con ABA y GA₃ modifican los contenidos de antocianos en hojas de plantas de vid

A diferencia de lo ocurrido en hollejos de bayas de vid, los antocianos en hojas se encuentran en muy bajas concentraciones. Asimismo, sólo se pudieron identificar el 50 % de los compuestos observados en hollejos. Dentro de los 8 antocianos identificados, sólo la malvidina-3-glucósido y la peonidina-3-glucósido se encontraron en los tratamientos GA₃ y control, los restantes sólo pudieron identificarse en las hojas tratadas con ABA (Figura 5.9). Las aplicaciones con ABA incrementaron significativamente las concentraciones de peonidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido en comparación con los restantes tratamientos,

mientras que no se encontró diferencias significativas entre las plantas tratadas con GA₃ y las controles. De acuerdo a las concentraciones relativas de los antocianos (Figura 5.10), el tratamiento con GA₃ incrementó la malvidina-3-glucósido y disminuyó la peonidina-3-glucósido en comparación con los restantes tratamientos. Por otro lado, el ABA no modificó la concentración relativa de la malvidina-3-glucósido en comparación con el control, pero sí disminuyó la concentración relativa de peonidina-3-glucósido. Asimismo, el segundo compuesto más abundante en dicho tratamiento fue la malvidina-3-p-cumarilada.

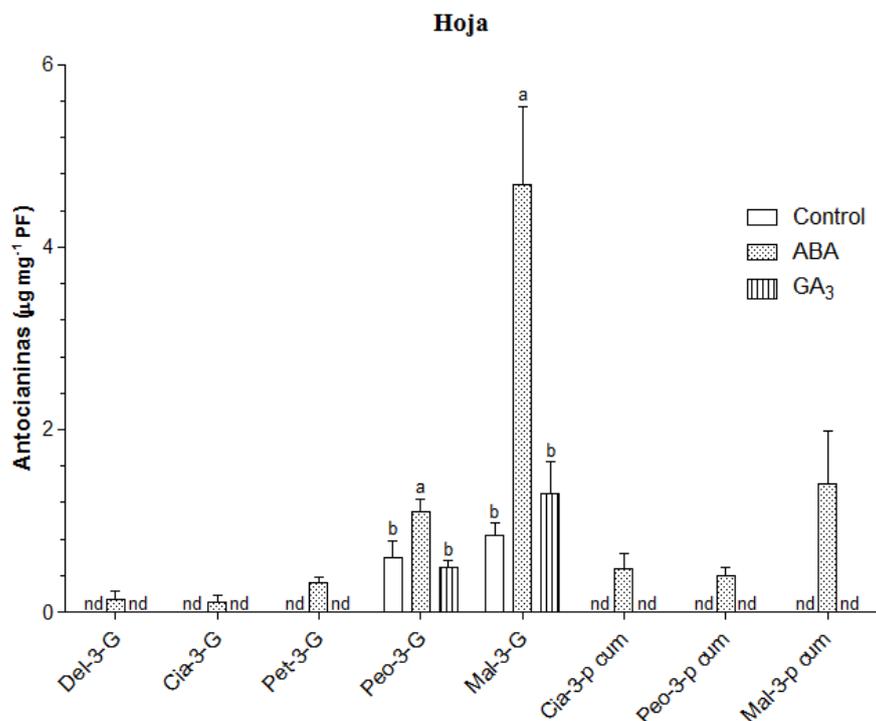


Figura 5.9. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de antocianos (µg mg⁻¹ PF) medidos en hojas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). nd: no detectado; Del-3-G: Delfinidina-3-Glucósido; Cia-3G: Cianidina-3-Glucósido; Pet-3-G: Petunidina-3-Glucósido; Peo-3-G: Peonidina-3-Glucósido; Mal-3-G: Malvidina-3-Glucósido; Cia-3-p cum: Cianidina-3-p cumarilada; Peo-3-p cum: Peonidina-3-p cumarilada; Mal-3-p cum: Malvidina-3-p cumarilada.

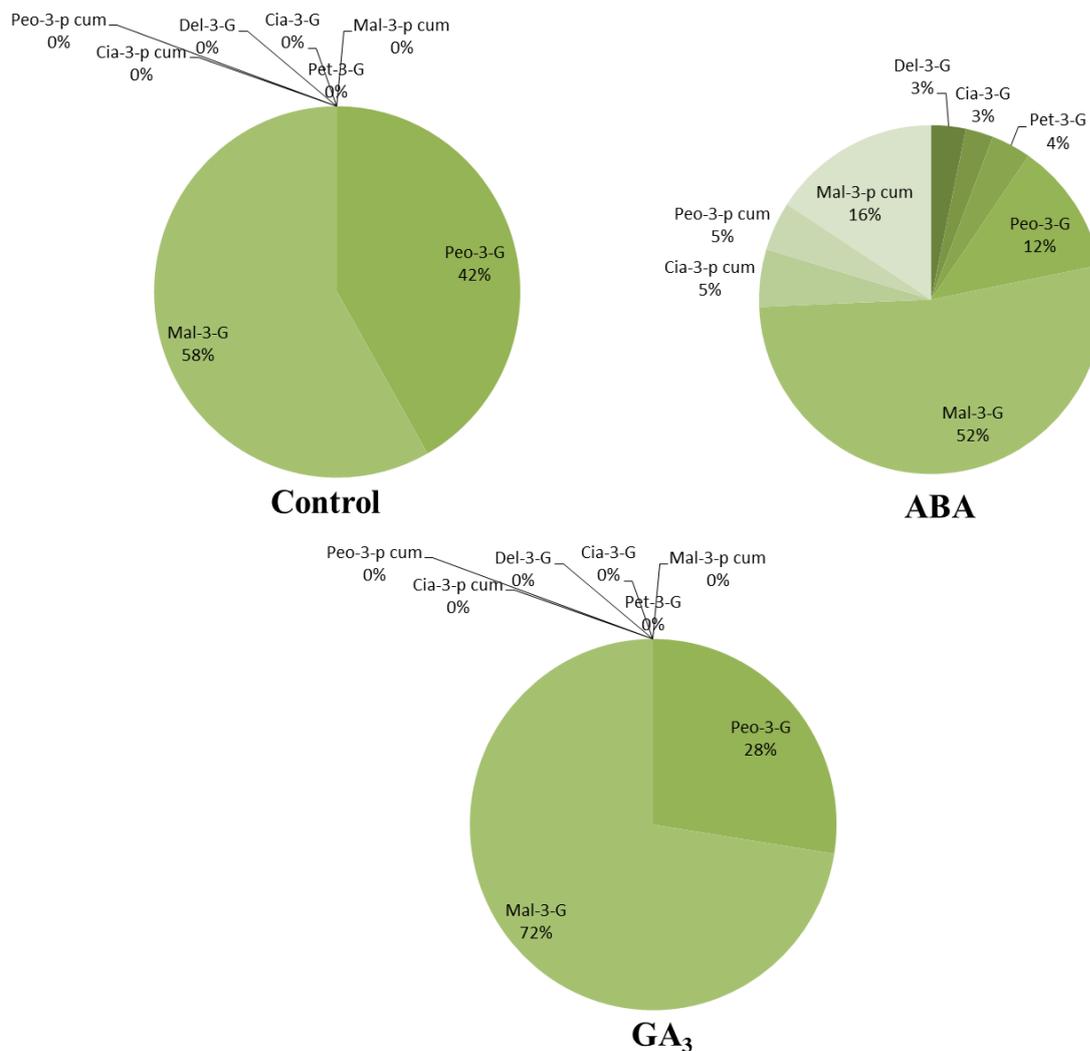


Figura 5.10. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de antocianos (expresada en %) en hojas de plantas de vid en invierno (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Del-3-G: Delfinidina-3-Glucósido; Cia-3G: Cianidina-3-Glucósido; Pet-3-G: Petunidina-3-Glucósido; Peo-3-G: Peonidina-3-Glucósido; Mal-3-G: Malvidina-3-Glucósido; Cia-3-p cum: Cianidina-3-p cumarilada; Peo-3-p cum: Peonidina-3-p cumarilada; Mal-3-p cum: Malvidina-3-p cumarilada.

5.3.6 Las aplicaciones con ABA y GA₃ modifican los contenidos de PBPM en hojas de plantas de vid

Como se puede apreciar en la Figura 5.11, en hojas de plantas de vid se lograron identificar 7 compuestos polifenólicos de bajo peso molecular. Las aplicaciones con GA₃ incrementaron significativamente los contenidos de (-)-epigallocatequin galato, mientras que provocó una disminución significativa de las concentraciones de los compuestos ácido caftárico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, quercetin-3-glucósido y kaempferol-3-glucósido en comparación con el control. Asimismo, no se observaron diferencias entre GA₃ y los restantes tratamientos en relación al compuesto (-)-galocatequin galato. Las aplicaciones con ABA produjeron una disminución significativa de las concentraciones de los compuestos (-)-epigallocatequin galato y kaempferol-3-glucósido en comparación con el control, mientras que no se encontraron

diferencias entre ABA y control en relación a los restantes compuestos identificados. La Figura 5.12 muestra las concentraciones relativas de los PBPM en hojas de plantas de vid en los tres tratamientos. El compuesto mayoritario, independientemente del tratamiento, fue el ácido caftárico con una concentración relativa superior al 90 %. No hubieron diferencias en relación a los contenidos relativos de los compuestos entre ABA y control, mientras que las hojas tratadas con GA₃ mostraron una pequeña disminución de la concentración relativa del ácido caftárico y un pequeño aumento del contenido relativo del (-)-epigalocatequin galato en comparación con los restantes tratamientos.

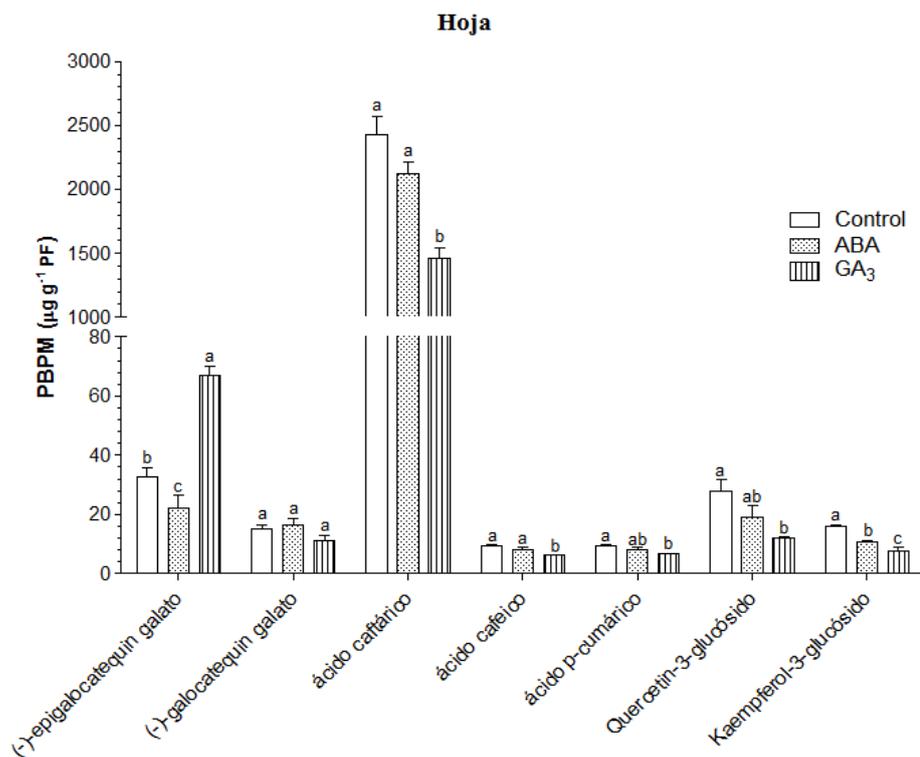


Figura 5.11. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de polifenoles de bajo peso molecular (PBPM, µg g⁻¹ PF) medidos en hojas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05).

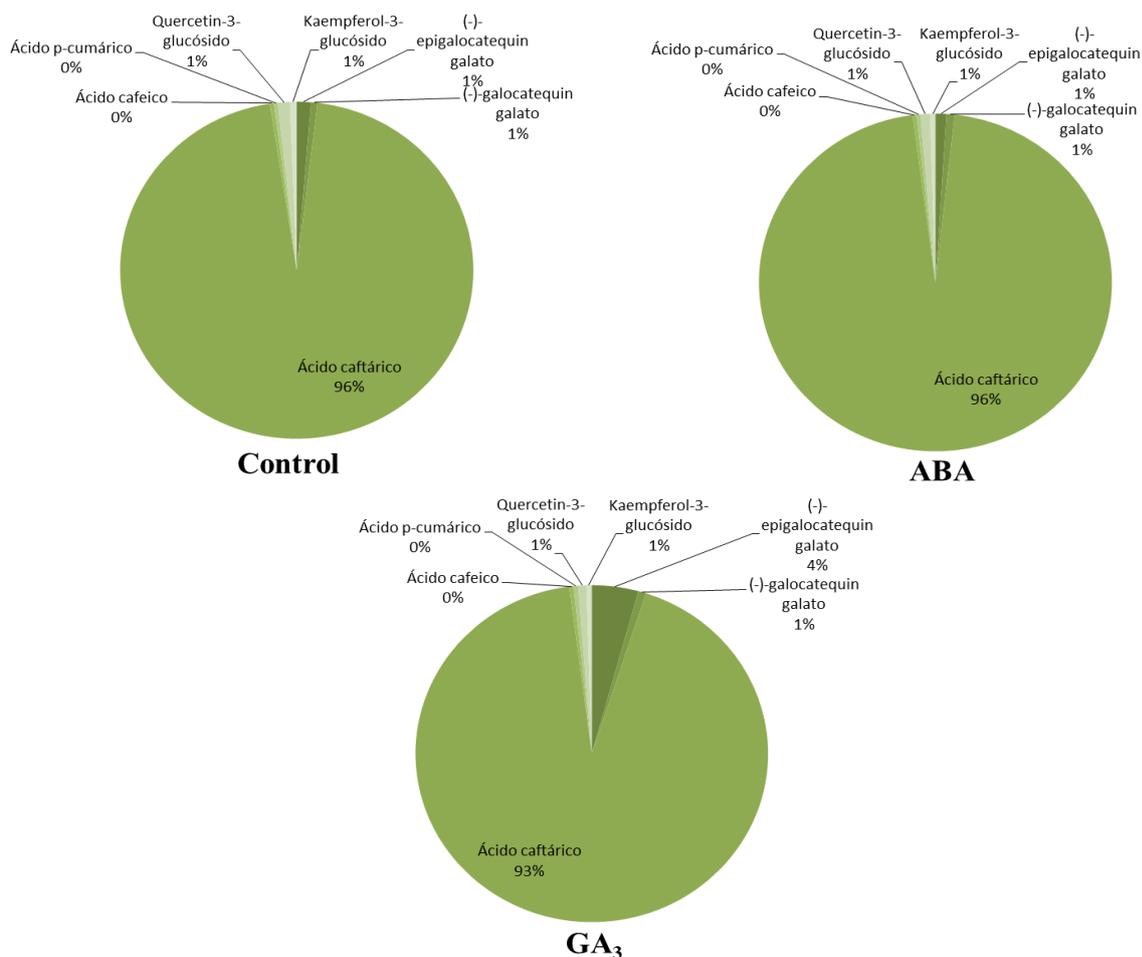


Figura 5.12. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de polifenoles de bajo peso molecular (expresada en %) en hojas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃).

5.3.7 Las aplicaciones con ABA y GA₃ modifican los contenidos de PBPM en bayas de plantas de vid

En hollejos de bayas de plantas de vid se pudieron identificar 9 compuestos polifenólicos de bajo peso molecular, dos más que los identificados en hojas (Figura 5.13). Asimismo, el ácido caftárico, que fue el compuesto mayoritario en hojas, no se logró identificar en hollejos. Además, las concentraciones de los PBPM en hollejos fueron más bajas que aquellos en hojas. Las aplicaciones con ABA redujeron significativamente las concentraciones de los compuestos ácido sirínigico y (-)-epicatequina comparados con el control, mientras que no se encontraron diferencias significativas con respecto a los restantes compuestos entre ambos tratamientos. Las plantas tratadas con GA₃ mostraron una disminución significativa en el compuesto (-)-galocatequina en comparación con los restantes tratamientos, mientras que no se observaron diferencias estadísticas en los demás compuestos entre GA₃ y el control. De acuerdo a las concentraciones relativas de los PBPM (Figura 5.14), se pudo observar que el compuesto mayoritario en hollejos de bayas de vid fue la (+)-catequina. Las aplicaciones con

ABA produjeron un incremento notorio del contenido relativo del compuesto (+)-catequina con una correspondiente reducción de las concentraciones relativas de los compuestos (-)-epicatequina, ácido p-cumárico y quercetin-3-glucósido en comparación con el control. Por otro lado, las aplicaciones con GA₃ provocaron un incremento notorio en la concentración relativa del compuesto (-)-epigallocatequin galato con la correspondiente disminución del contenido relativo de los compuestos (-)-galocatequina y quercetin-3-glucósido comparado con el control.

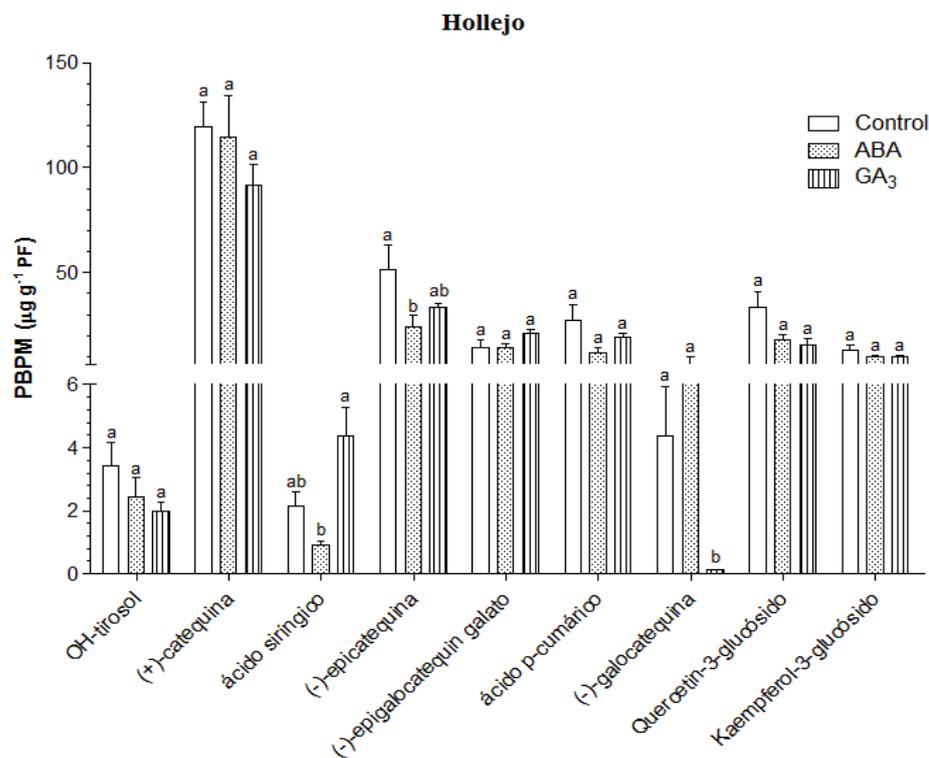


Figura 5.13. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de polifenoles de bajo peso molecular (PBPM, µg g⁻¹ PF) medidos en hollejos de bayas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05).

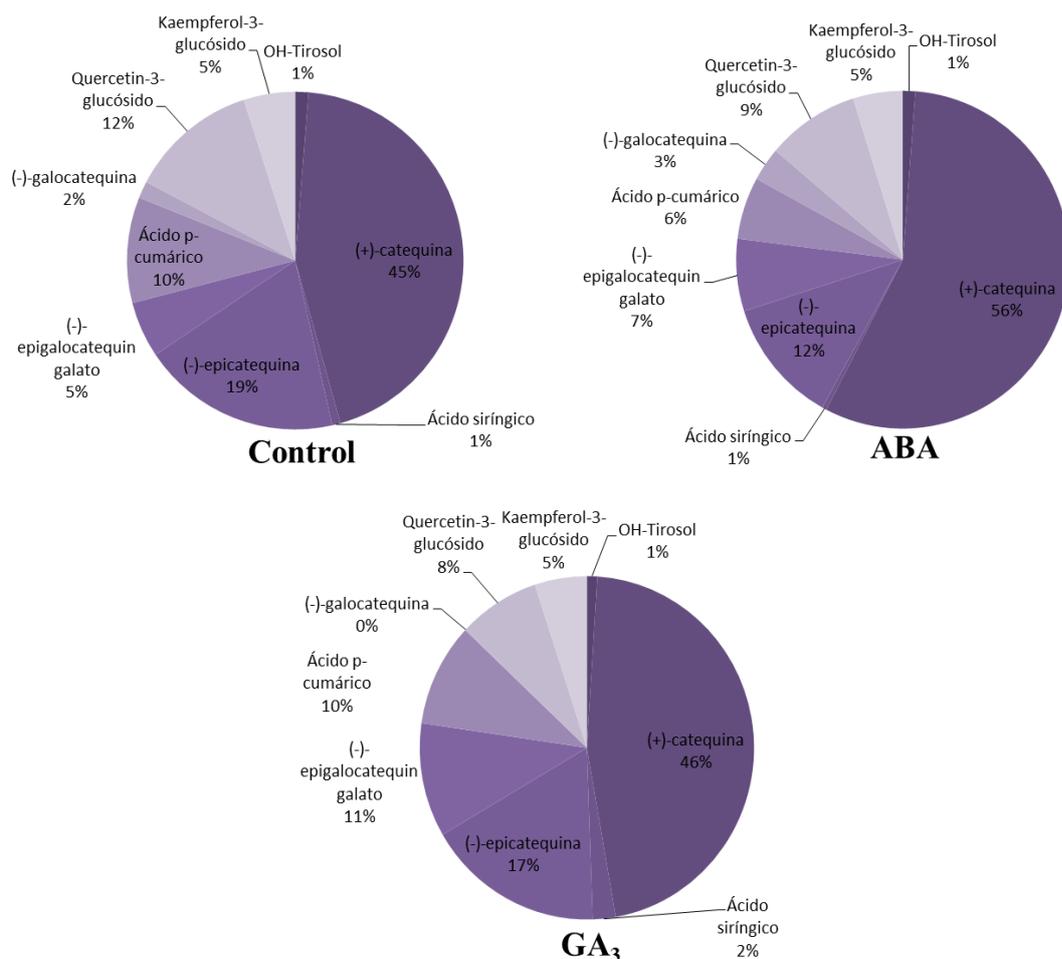


Figura 5.14. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de polifenoles de bajo peso molecular (expresada en %) en hollejos de bayas de plantas de vid en invierno (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃).

5.3.8 Las aplicaciones con ABA y GA₃ modifican los contenidos de PBPM en raíces de plantas de vid

En raíces de plantas de vid se pudieron identificar, como en hojas, 7 compuestos polifenólicos de bajo peso molecular (Figura 5.15). Asimismo, las concentraciones de los PBPM en este tejido fueron más bajas que aquellos en hojas y hollejos. No se observaron diferencias significativas en la concentración de ningún compuesto identificado, a excepción de la (-)-epigallocatequin galato que mostró un incremento significativo en raíces de las plantas tratadas con los reguladores de crecimiento. Como lo sucedido en hollejos, el compuesto mayoritario en raíces fue la (+)-catequina, pero a diferencia de lo encontrado en hollejos, el segundo compuesto con mayor contenido relativo en raíces fue el ácido caftárico (Figura 5.16). Las aplicaciones con GA₃ provocaron un incremento en el contenido relativo del compuesto (-)-epigallocatequin galato con la correspondiente disminución de las concentraciones relativas de

los compuestos ácido siríngico y ácido caftarico en relación al control. Por otro lado, no se observaron modificaciones importantes en el contenido relativo de PBPM entre los tratamientos ABA y control.

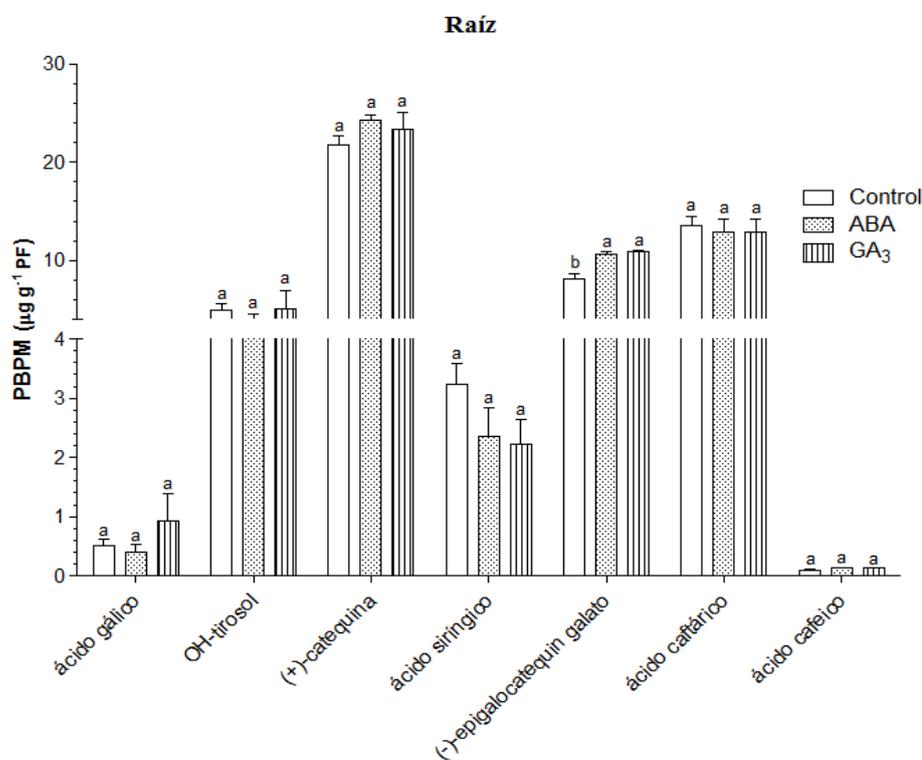


Figura 5.15. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de polifenoles de bajo peso molecular (PBPM, µg g⁻¹ PF) medidos en raíces de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05).

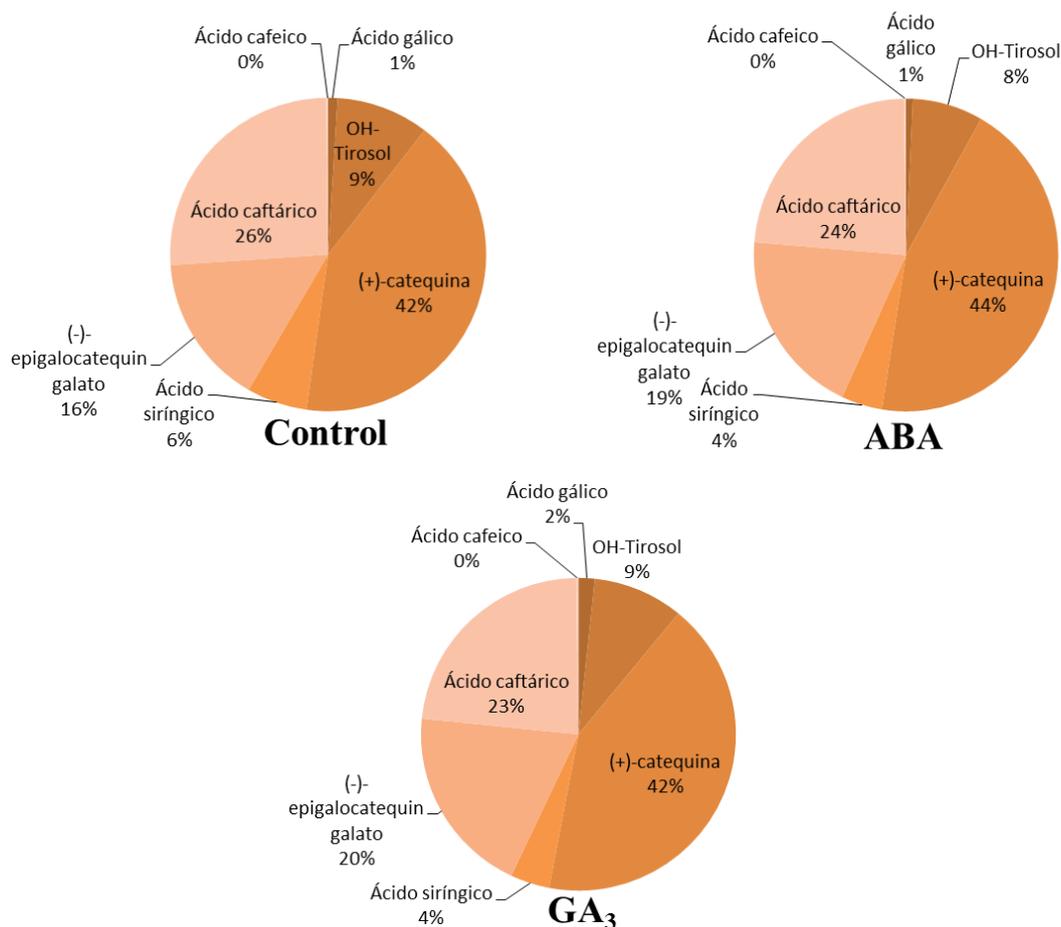


Figura 5.16. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de polifenoles de bajo peso molecular (expresada en %) en raíces de plantas de vid en invierno (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃).

5.3.9 Las aplicaciones con ABA y GA₃ modifican los contenidos de terpenos en hojas de plantas de vid

En el Cuadro 5.1 se pueden observar los 5 monoterpenos identificados en hojas de plantas de vid tratadas con los reguladores de crecimiento. No se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los monoterpenos encontrados entre las fitohormonas, a excepción del terpeno cimene cuya concentración se vio incrementada con la aplicación de ABA. En la Cuadro 5.2 se encuentran los sesquiterpenos identificados en las hojas de plantas de vid. Al igual que lo sucedido con los monoterpenos, no se pudieron detectar sesquiterpenos en los tejidos de las plantas controles. Asimismo, las aplicaciones con ABA incrementaron significativamente las concentraciones de los terpenos α - y β -farneseno y bergamoteno con respecto al tratamiento GA₃. Por otro lado, no hubo diferencias estadísticas entre ambas fitohormonas en relación a los sesquiterpenos nerolidol y farnesol. En la Cuadro 5.3 se pueden observar los triterpenos identificados en las hojas de plantas de vid. En este caso se pudieron

detectar los compuestos en los tres tratamientos. Las aplicaciones con las fitohormonas mostraron un incremento significativo del escualeno con respecto al control. Asimismo, las aplicaciones con los reguladores de crecimiento provocaron una disminución significativa de los esteroides α -tocoferol, estigmasterol y γ -sitosterol con respecto al control. Además, las aplicaciones con ABA incrementaron el contenido de estigmasterol comparado con el tratamiento GA₃. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos en relación al compuesto taraxasterol. La Figura 5.17 muestra el contenido relativo de los terpenos medidos en los tres tratamientos de las hojas de plantas de vid. Como en las plantas controles no se pudieron detectar mono- y sesquiterpenos, el compuesto más abundante fue el α -tocoferol, seguido por el γ -sitosterol y el escualeno. En cambio, en las hojas tratadas con las fitohormonas los compuestos más abundantes fueron terpinoleno, nerolidol y farnesol. Las hojas tratadas con ABA mostraron un mayor contenido relativo del compuesto terpinoleno, en cambio, el tratamiento con GA₃ provocó una disminución del contenido relativo de dicho terpeno, en comparación con el tratamiento ABA, en correspondencia con un incremento de la concentración relativa del compuesto nerolidol.

Cuadro 5.1. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de monoterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en hojas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). nd: no detectado.

Tratamiento	Cimene (ng mg ⁻¹ PF)	D-limoneno (ng mg ⁻¹ PF)	Eucaliptol (ng mg ⁻¹ PF)	γ -terpineno (ng mg ⁻¹ PF)	Terpinoleno (ng mg ⁻¹ PF)
Control	nd	nd	nd	nd	nd
ABA	41.34 \pm 4.15 a	55.41 \pm 4.88 a	26.36 \pm 3.43 a	425.90 \pm 39.07 a	9526.01 \pm 827.34 a
GA ₃	16.12 \pm 3.57 b	36.36 \pm 9.49 a	19.46 \pm 4.64 a	248.22 \pm 62.13 a	6981.09 \pm 1711.06 a

Cuadro 5.2. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de sesquiterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en hojas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). nd: no detectado.

Tratamiento	β -farneseno (ng mg ⁻¹ PF)	Bergamoteno (ng mg ⁻¹ PF)	α -farneseno (ng mg ⁻¹ PF)	Nerolidol (ng mg ⁻¹ PF)	Farnesol (ng mg ⁻¹ PF)
Control	nd	nd	nd	nd	nd
ABA	147.96 \pm 34.76 a	27.20 \pm 5.72 a	44.76 \pm 10.49 a	3903.48 \pm 586.12 a	4229.93 \pm 391.64 a
GA ₃	19.31 \pm 5.29 b	3.84 \pm 0.39 b	12.13 \pm 0.60 b	5278.33 \pm 2297.05 a	3721.05 \pm 961.36 a

Cuadro 5.3. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de triterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en hojas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). nd: no detectado.

Tratamiento	Escualeno (ng mg ⁻¹ PF)	α-tocoferol (ng mg ⁻¹ PF)	Estigmasterol (ng mg ⁻¹ PF)	γ-sitosterol (ng mg ⁻¹ PF)	Taraxasterol (ng mg ⁻¹ PF)
Control	199.37 ± 21.35 <i>b</i>	643.58 ± 84.62 <i>a</i>	30.73 ± 0.92 <i>a</i>	372.76 ± 24.17 <i>a</i>	41.98 ± 6.36 <i>a</i>
ABA	204.29 ± 20.64 <i>a</i>	372.64 ± 71.60 <i>b</i>	14.45 ± 1.59 <i>b</i>	185.61 ± 18.04 <i>b</i>	31.48 ± 1.98 <i>a</i>
GA₃	298.74 ± 16.43 <i>a</i>	213.49 ± 33.33 <i>b</i>	9.46 ± 0.59 <i>c</i>	146.69 ± 4.99 <i>b</i>	43.24 ± 2.49 <i>a</i>

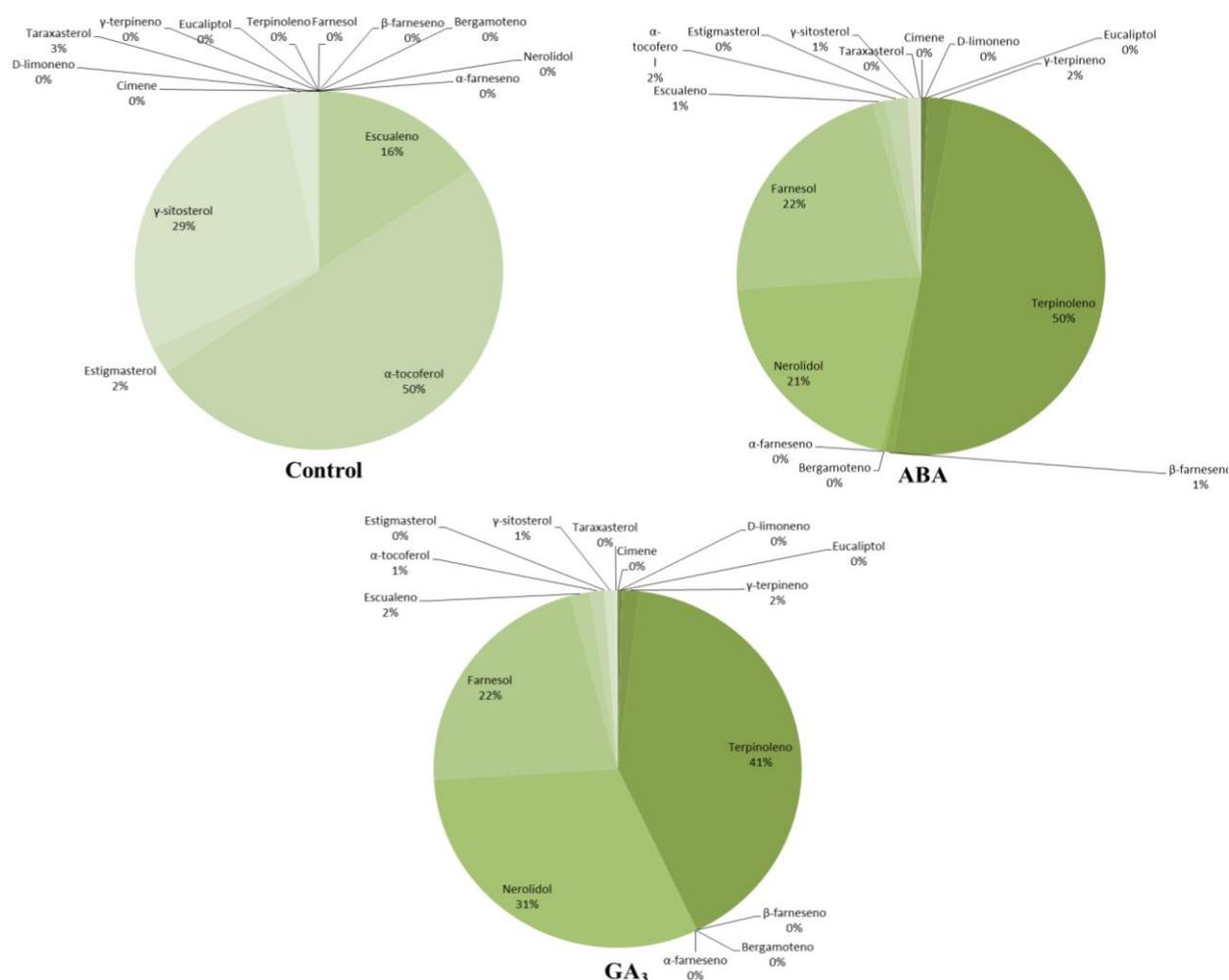


Figura 5.17. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de terpenos (expresada en %) en hojas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃).

5.3.10 Las aplicaciones con ABA y GA₃ modifican los contenidos de terpenos en bayas de plantas de vid.

En el caso de hollejos de plantas de vid, solo se pudieron identificar 3 monoterpenos (pineno, γ -terpineno y terpinoleno) y un sesquiterpeno (nerolidol, Cuadro 5.4). Al igual que lo ocurrido en las hojas, en los controles no se pudo detectar la presencia de monoterpenos ni de sesquiterpenos. Las plantas tratadas con ABA y GA₃ no mostraron diferencias significativas en relación a los mono- y sesquiterpenos medidos (Cuadro 5.4). Por otro lado, se pudieron identificar 5 triterpenos en hollejos de bayas de vid (Cuadro 5.5). No se observaron diferencias significativas entre los tres tratamientos en relación a los compuestos escualeno y α -tocoferol. Por otro lado, las aplicaciones con GA₃ incrementaron las concentraciones de ergostenol y estigmasterol comparadas con los restantes tratamientos. Además, el esteroide γ -sitosterol sólo pudo ser identificado en el tratamiento control. De acuerdo a los contenidos relativos de los terpenos en hollejos, el compuesto preponderante en el tratamiento control fue el esteroide γ -sitosterol, mientras que los compuestos más abundantes en los hollejos tratados con los reguladores de crecimiento fueron terpinoleno y nerolidol (Figura 5.18). Asimismo, las aplicaciones con GA₃ incrementaron las concentraciones relativas de α -tocoferol y ergostenol en comparación con las concentraciones relativas de estos compuestos en el tratamiento ABA.

Cuadro 5.4. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de mono- y sesquiterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en hollejos de bayas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado.

Tratamiento	Pineno (ng mg ⁻¹ PF)	γ -terpineno (ng mg ⁻¹ PF)	Terpinoleno (ng mg ⁻¹ PF)	Nerolidol (ng mg ⁻¹ PF)
Control	nd	nd	nd	nd
ABA	3.27 \pm 0.87 a	1.02 \pm 0.29 a	27.00 \pm 6.23 a	27.12 \pm 2.08 a
GA ₃	3.40 \pm 1.10 a	0.73 \pm 0.21 a	23.38 \pm 4.40 a	22.28 \pm 4.29 a

Cuadro 5.5. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de triterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en hollejos de bayas de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias \pm EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). nd: no detectado.

Tratamiento	Escualeno (ng mg ⁻¹ PF)	α -tocoferol (ng mg ⁻¹ PF)	Ergostenol (ng mg ⁻¹ PF)	Estigmasterol (ng mg ⁻¹ PF)	γ -sitosterol (ng mg ⁻¹ PF)
Control	7.73 \pm 2.29 a	7.11 \pm 3.46 a	2.06 \pm 0.19 c	2.71 \pm 1.49 b	43.13 \pm 9.56 a
ABA	11.45 \pm 2.80 a	6.47 \pm 4.98 a	3.85 \pm 0.87 b	2.20 \pm 0.42 b	nd
GA ₃	8.72 \pm 3.44 a	9.95 \pm 3.60 a	5.62 \pm 1.21 a	4.16 \pm 0.89 a	nd

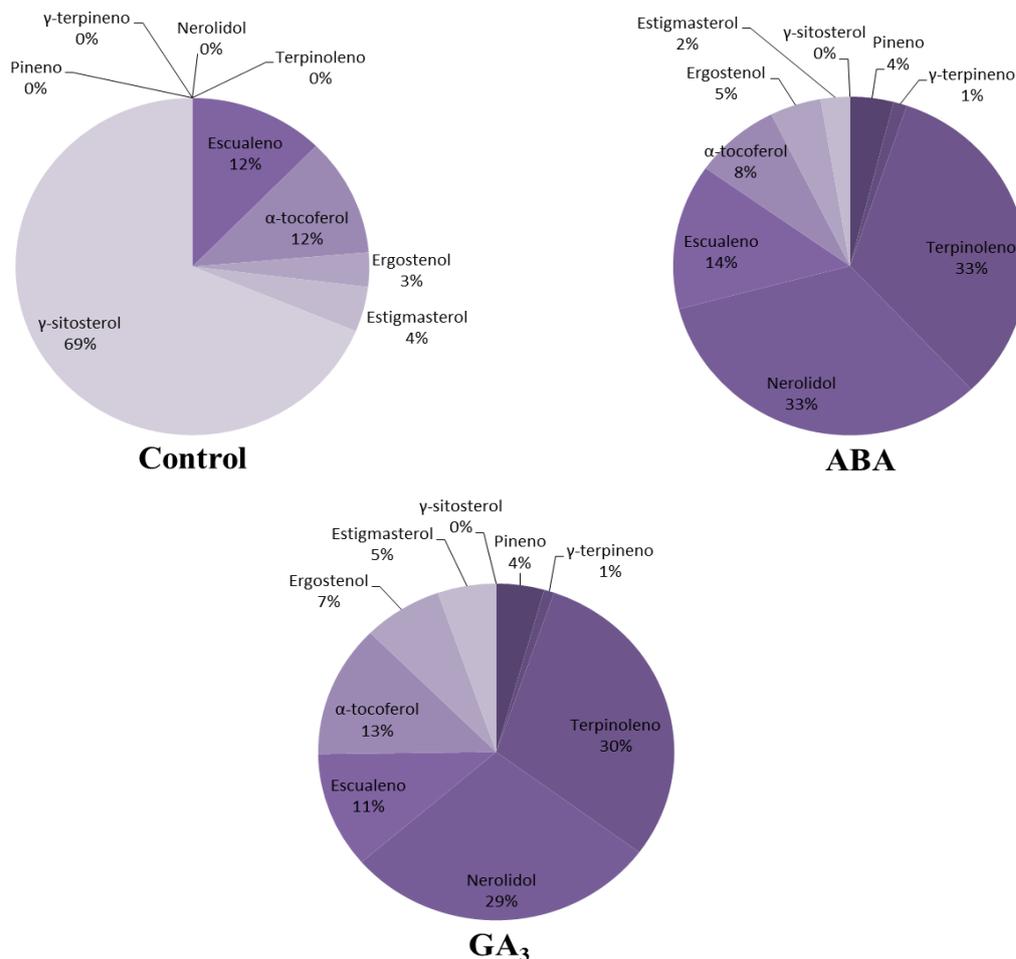


Figura 5.18. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de terpenos (expresada en %) en hollejos de bayas de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃).

5.3.11 Las aplicaciones con ABA y GA₃ modifican los contenidos de terpenos en raíces de plantas de vid

En las raíces de plantas de vid sólo se identificó un solo sesquiterpeno (nerolidol) y ningún monoterpeno (Cuadro 5.6). Asimismo, se identificaron 7 triterpenos (Cuadro 5.6). Las aplicaciones con las fitohormonas incrementaron significativamente el contenido de nerolidol, mientras que no se pudo detectar dicho compuesto en las raíces controles. El tratamiento GA₃ provocó un aumento significativo en las concentraciones de los esteroides escualeno, α-tocoferol, ergostenol, estigmasterol, γ-sitosterol, taraxasterol y betulina en comparación con el tratamiento control; mientras que no hubo diferencias significativas en la mayoría de los triterpenos entre los tratamientos ABA y GA₃, a excepción del compuesto betulina el cual registró un incremento significativo en las plantas tratadas con ABA. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ABA y control con respecto a los compuestos α-tocoferol y ergostenol. De acuerdo a los contenidos relativos de los distintos terpenos en raíces (Figura 5.19), el terpeno de mayor abundancia en los controles fue el γ-sitosterol. Por otro lado, en las plantas tratadas con los reguladores de crecimiento el compuesto más abundante fue el escualeno. Asimismo, las aplicaciones con GA₃

incrementaron el contenido relativo del escualeno con una consiguiente disminución en la concentración relativa del taraxasterol en comparación con el tratamiento ABA.

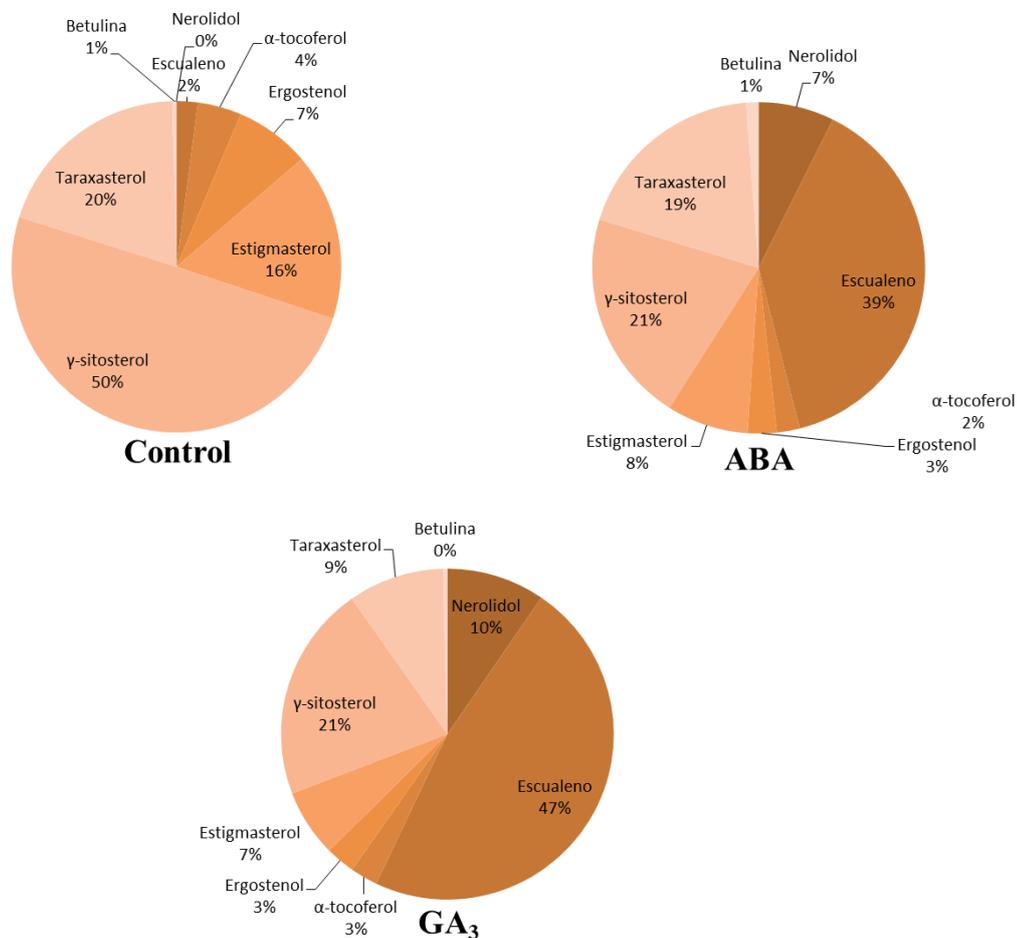


Figura 5.19. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración relativa de terpenos (expresada en %) en raíces de plantas de vid en envero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃).

Cuadro 5.6. Efecto de ABA y GA₃ sobre la concentración de sesqui- y triterpenos (ng mg⁻¹ PF) medidos en raíces de plantas de vid en enero (a los 70 DDA en plantas control, a los 63 DDA en plantas tratadas con ABA y a los 75 DDA en plantas tratadas con GA₃). Los valores corresponden a medias ± EE, n=4. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). nd: no detectado.

Tratamiento	Nerolidol (ng mg ⁻¹ PF)	Escualeno (ng mg ⁻¹ PF)	α -tocoferol (ng mg ⁻¹ PF)	Ergostenol (ng mg ⁻¹ PF)	Estigmasterol (ng mg ⁻¹ PF)	γ -sitosterol (ng mg ⁻¹ PF)	Taraxasterol (ng mg ⁻¹ PF)	Betulina (ng mg ⁻¹ PF)
Control	nd	3.93 ± 0.85 <i>b</i>	8.03 ± 3.73 <i>b</i>	13.85 ± 2.77 <i>b</i>	30.68 ± 5.12 <i>b</i>	93.48 ± 20.11 <i>b</i>	37.09 ± 15.28 <i>b</i>	0.75 ± 0.08 <i>c</i>
ABA	62.83 ± 10.59 <i>a</i>	329.59 ± 44.36 <i>a</i>	18.93 ± 3.13 <i>ab</i>	24.03 ± 3.74 <i>ab</i>	67.73 ± 9.82 <i>a</i>	176.60 ± 24.71 <i>a</i>	162.61 ± 19.00 <i>a</i>	10.37 ± 1.64 <i>a</i>
GA ₃	101.58 ± 21.01 <i>a</i>	504.77 ± 95.99 <i>a</i>	28.31 ± 2.75 <i>a</i>	30.57 ± 4.06 <i>a</i>	69.88 ± 7.35 <i>a</i>	224.27 ± 35.11 <i>a</i>	99.18 ± 29.69 <i>a</i>	4.42 ± 0.73 <i>b</i>

5.4 Discusión

Los metabolitos secundarios presentes en las bayas de vid son un factor clave en las características organolépticas del vino (Conde et al. 2007), de allí la importancia de conocer el perfil de estos compuestos desde un punto de vista enológico. Por otro lado, se conoce que están involucrados en la respuesta de la planta a señales del ambiente, biótico y abiótico (Grassmann et al. 2002, Berli et al. 2010, Nagegowda 2010, Gil et al. 2012, Escoriza et al. 2013). En este sentido, las plantas los sintetizan como compuestos de defensa ya sea en una situación de estrés oxidativo, herbivoría y patógenos. En esta sección de la tesis, se analizó el perfil y concentración de dos tipos de metabolitos secundarios (polifenoles y terpenos) como así también de aminoácidos libres con implicancias en la calidad de los vinos, en tres órganos de la planta: hoja, baya y raíz, en un solo momento fenológico (envero).

Las aplicaciones con los reguladores de crecimiento provocaron un incremento significativo tanto de monoterpenos como de sesquiterpenos en los tres órganos de la planta; mientras que no se detectó la presencia de estos compuestos en las plantas controles. De lo anterior se desprende que tanto ABA como GA₃ indujeron la síntesis de novo de mono- y sesquiterpenos. Asimismo, al realizarse las aplicaciones únicamente sobre la parte aérea y al observar las altas concentraciones del sesquiterpeno nerolidol en raíces de plantas tratadas con ambos reguladores de crecimiento, se puede inferir que ABA y GA₃ intervienen en una respuesta sistémica. Por otro lado, las aplicaciones con los reguladores de crecimiento no incrementaron las concentraciones de los esteroides de membrana (triterpenos) en hojas y hollejo. Esto puede atribuirse a una suerte de competencia entre la síntesis de mono-, sesquiterpenos y de triterpenos. Es por ello que en la raíz, al sintetizarse únicamente el sesquiterpeno nerolidol en las plantas tratadas con los reguladores de crecimiento, se pudieron observar mayores concentraciones de los esteroides de membrana en relación al control.

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo confirman que la síntesis de terpenos estarían mediando la defensa contra estrés oxidativo provocado por radiación UV-B (Gil et al. 2012, Alonso et al. 2015) y contra patógenos (Salomon et al. 2014). Asimismo, tales estreses (abióticos y bióticos) provocaron un incremento en la concentración de la hormona ABA (Berli et al. 2010, Gil et al. 2012, Salomon et al. 2014). Teniendo en cuenta lo anterior y los resultados obtenidos en la presente tesis, es que se infiere que el ABA interviene como molécula señal en respuesta a señales del ambiente tanto biótico como abiótico, induciendo la síntesis de terpenos. Por otro lado, estudios realizados en flores de la especie *Arabidopsis thaliana* sugieren que el factor de transcripción MYC2 se une a las regiones promotoras de los genes *TPS21* y *TPS11*, que codifican para dos terpeno sintasas, activando su expresión. Además, se observó que las proteínas DELLAs (represores de la señalización de giberelinas) interactúan físicamente con el factor de transcripción MYC2 (Hong et al. 2012). De lo anterior se desprende que las aplicaciones con GA₃ en plantas de vid incrementaron la síntesis de mono- y sesquiterpenos, debido posiblemente, a un mecanismo semejante a lo observado en *Arabidopsis thaliana*. Es decir, las aplicaciones con el regulador de crecimiento provocaron la degradación de proteínas DELLAs con la consiguiente liberación del factor de transcripción MYC2 y la posterior síntesis de terpenos por acción de las enzimas terpeno sintasas.

Las bayas de vid presentan, además de azúcares y ácidos orgánicos (como ya se ha observado en capítulos anteriores) una amplia gama de polifenoles flavonoides (antocianinas, flavonoles y flavanoles) y no flavonoides (estilbenos, ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos, Conde et al. 2007). Estos compuestos son de particular interés ya que definen las características organolépticas, nutricionales y nutraceuticas de las bayas de vid. Asimismo, las antocianinas tienen una elevada capacidad antioxidante y, como componentes de la dieta del hombre, tienen efectos beneficiosos contra enfermedades degenerativas y ciertos tipos de cánceres (Martin et al. 2013). En esta sección se evaluaron los efectos de las aplicaciones exógenas con ABA y GA₃ sobre la concentración de polifenoles flavonoides y no flavonoides tanto en hoja, hollejo como raíces de plantas de vid.

Se observó que las aplicaciones con ABA no modificaron los contenidos de ninguno de los antocianos detectados en hollejo con respecto al control. Sin embargo, considerando que las extracciones de las bayas de las plantas tratadas con ABA se realizaron una semana antes a la cosecha de las plantas controles, se podría afirmar que ABA adelanta la maduración, con el consiguiente adelanto de la síntesis de antocianos en las bayas. Las aplicaciones con GA₃, además de retrasar la maduración, provocó una disminución significativa de la mayoría de los antocianos determinados en envero. Esto podría estar relacionado con los mayores contenidos de glucosa y fructosa encontrados en las bayas tratadas con dicho regulador de crecimiento al final del experimento (capítulo 3). Es decir, posiblemente, el mayor contenido de azúcares pudo deberse a que éstos no fueron utilizados como fuente de carbono para la síntesis de antocianos. Por lo tanto, si bien un mayor contenido de azúcares es beneficioso para la industria vitivinícola, la disminución del contenido de polifenoles flavonoides, dado por GA₃, representa una gran desventaja al momento de considerar su uso como herramienta tecnológica.

Con respecto a las hojas, las aplicaciones con ABA indujeron la síntesis de antocianos. Experimentos a campo llevados a cabo por miembros de nuestro grupo de trabajo demostraron que la radiación UV-B provocó la síntesis de compuestos polifenólicos en hojas de plantas del cv. Malbec (Berli et al. 2010). La síntesis de estos compuestos estaría relacionada con una respuesta contra el daño por estrés oxidativo dado por especies reactivas del oxígeno (EROS). En este sentido, el ABA, al igual que lo observado con los terpenos, estaría actuando como la molécula señal que media la respuesta contra estrés abiótico. Sin embargo, al analizar los polifenoles de bajo peso molecular (polifenoles no flavonoides), a diferencia de lo observado por Berli et al. (2010), tanto la quercetin-3-glucósido como el kampferol-3-glucósido (dos compuestos asociados contra el daño oxidativo) bajan significativamente su concentración con respecto al control. Esto estaría sugiriendo que la radiación UV-B tendría una respuesta dependiente y otra independiente a ABA.

Los aminoácidos juegan un papel fundamental en la calidad del vino. En este sentido, los aminoácidos son los precursores de algunos compuestos volátiles formados durante la fermentación, por ej. ésteres y alcoholes superiores (Henschke y Jiranek 1993, Rapp y Versisni 1996). Por otro lado, como los aminoácidos están asociados con el sabor, los aminoácidos no asimilados por las levaduras contribuyen a las características organolépticas de los vinos. En la presente tesis, se trató de correlacionar el perfil y la concentración de los distintos aminoácidos con la síntesis de metabolitos secundarios en los distintos órganos de la planta de vid.

De acuerdo a lo explicado en el párrafo anterior, las menores concentraciones del aminoácido L-fenilalanina y L-tirosina (precursores de la ruta de los fenilpropanoides), en hojas tratadas con ABA, se correspondieron con el incremento de la concentración de antocianinas en dicho tejido. Por otro lado, las mayores concentraciones de los aminoácidos ácidos como: L-asparagina, L-ácido glutámico y L-ácido aspártico, en las hojas tratadas con ABA, podrían estar relacionadas con una respuesta al daño por estrés oxidativo. Asimismo, los mayores contenidos del aminoácido L-prolina estarían relacionados con el ajuste osmótico en plantas de vid, ya que se sabe que dicho aminoácido se encuentra asociado con respuestas a estrés osmótico y estrés oxidativo. En relación al tejido hollejo, las mayores concentraciones del aminoácido aromático L-tirosina se correlacionó con los menores contenidos de antocianos en bayas tratadas con GA₃. Asimismo, las concentraciones semejantes de L-fenilalanina y L-tirosina entre ABA y control se correspondieron con los contenidos de antocianinas en las bayas de estos tratamientos (sin diferencias significativas). Se observó que en bayas de vid, la L-prolina fue uno de los aminoácidos más abundantes, en coincidencia con lo observado por Stines et al. (2000). Se sabe que la concentración de este aminoácido está regulado por un balance entre la síntesis y el catabolismo (Deuschle et al. 2004). Asimismo, estudios de proteómica de bayas de vid tratadas con ABA sugieren que este regulador de crecimiento disminuiría los contenidos de la enzima que cataboliza L-prolina (Giribaldi et al. 2010). Además, se sabe que la concentración de ABA aumenta significativamente en envero en bayas de vid, lo que traería aparejado el inicio de la maduración. Dado que las bayas se extrajeron en el momento fenológico coincidente con el pico de ABA, los grandes contenidos de L-prolina se pudieron haber debido a la inhibición de la enzima que cataboliza dicho aminoácido.

Por otro lado, las mayores concentraciones de los aminoácidos detectados en raíz en el tratamiento control, se pudo deber a que una mayor cantidad de nitrógeno orgánico es acumulado en dicho órgano en relación a los tratamientos ABA y GA₃. En este sentido, las aplicaciones con los reguladores de crecimiento pudieron haber inducido una movilización del nitrógeno orgánico hacia la parte aérea de las plantas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en ésta sección, se puede aceptar parcialmente la hipótesis de trabajo V. Es decir, ABA y GA₃ modulan de forma diferencial la concentración de terpenos, aminoácidos y antocianos en hojas, bayas y raíces de plantas de vid cv. Malbec. Sin embargo, no se encontraron diferencias sustanciales en la concentración de los polifenoles de bajo peso molecular en los tres órganos de estudio entre los distintos tratamientos. Además, más investigaciones son necesarias para dilucidar el rol de los aminoácidos como precursores de los principales metabolitos secundarios en vid.

Capítulo 6: Discusión general

6.1 Discusión general

Las bayas de vid son frutos que acumulan grandes cantidades de azúcares en las vacuolas de las células del mesocarpo a partir del momento fenológico de envero. Aunque el transporte a larga distancia se realiza en forma de sacarosa, los azúcares son acumulados como hexosas, principalmente glucosa y fructosa (Conde et al. 2007). En la presente tesis, se observó que el ABA adelantó la fecha de inicio de la maduración de las bayas una semana con respecto al control, confirmando su rol como regulador de la maduración (Wheeler et al. 2009).

Como en la mayoría de los frutos, la acumulación de azúcares en las bayas de vid no sólo depende del carbono fijado durante la fotosíntesis sino que también de la fuerza de los destinos. En el presente trabajo, las plantas tratadas con ABA mostraron una disminución transiente de P_n causado por una disminución temporal de g_s dado por un cierre parcial de estomas. En el caso de las plantas tratadas con GA_3 se encontró una clara correlación entre g_s y P_n . Además, se observó una disminución en la densidad de estomas como así también del contenido de clorofilas totales, sugiriendo que la fotosíntesis fue afectada por la expansión foliar (efecto de dilución). De hecho, cuando g_s y P_n fueron expresados por unidad de planta, no se observaron diferencias entre los tratamientos GA_3 y control.

Es sabido que la fuerza que moviliza los fotoasimilados a través del floema es la diferencia de presión de turgencia entre dos zonas del mismo ($\Delta P = \Delta \Psi_p$, Taiz y Zeiger 1998). Asimismo, se cree que la carga floemática en la vid es pasiva, mediada por plasmodesmos (Slewinski et al. 2013). Por lo tanto, la concentración de sacarosa debe ser mayor en el citoplasma de las células del mesofilo para mantener el transporte. De acuerdo a la interpretación de los resultados presentados en esta tesis, el mecanismo general se explicita en la Figura 6.1.

El mayor contenido de sacarosa observado en las hojas tratadas con ABA y GA_3 en el estadio fenológico de envero podría estar relacionado con un efecto promotor sobre la carga floemática. Para dilucidar si la degradación de almidón en hojas está relacionada con el contenido de sacarosa, se realizaron mediciones del contenido de almidón y actividad amilasa. Se observó que el menor contenido de almidón en hojas tratadas con ABA debió ser una consecuencia de la menor tasa fotosintética por unidad de área en lugar de un incremento en la tasa de conversión de almidón a sacarosa, ya que la actividad amilasa no mostró diferencias con respecto al control. Por otro lado, las hojas de plantas tratadas con GA_3 mostraron una mayor concentración de sacarosa, lo que se explica como consecuencia de un efecto conjunto de una menor P_n por unidad de área y un incremento en la actividad de las amilasas. Además, se observó una baja concentración de hexosas en las hojas tratadas con los reguladores de crecimiento durante todo el desarrollo de la baya y no solamente durante envero. Es decir, que el alto contenido de sacarosa observado en envero no se puede explicar mediante la utilización de hexosas para su formación. De acuerdo a lo anterior, los resultados sugieren que la conversión almidón: sacarosa: monosacáridos no es lineal y por lo tanto otros procesos bioquímicos podrían estar regulando el balance de dichos compuestos en hojas del cv. Malbec.

Algunos reportes en vid sugieren que existiría una carga floemática activa, mediada por transportadores, que podría estar actuando conjuntamente con la carga floemática pasiva (Afoufa-Bastien et al. 2010, Hayes et al. 2010, Medici et al. 2014, Pastenes et al. 2014). Los resultados presentados en la presente tesis, dan nuevos indicios acerca de la regulación de los transportadores de azúcares por medio de ABA y GA₃ en plantas crecidas bajo condiciones de campo. Los resultados mostraron que las aplicaciones con las hormonas provocaron una disminución general en la expresión de los genes que codifican tanto para transportadores de hexosas como para transportadores de sacarosas. Es posible pensar entonces que la expresión de los genes *VvHT3*, *VvHT5* y *VvHT6*, al menos en hojas, podrían estar regulados por el contenido de hexosas en lugar de ABA y GA₃ debido a las modificaciones en la concentración de carbohidratos observadas en las plantas tratadas con los reguladores de crecimiento. Por otro lado, el mayor contenido de sacarosa y la menor expresión relativa de los genes *VvSUC12* y *VvSUC27*, en hojas tratadas con ABA y GA₃, sugieren una regulación negativa por sacarosa en el estadio fenológico de envero.

A partir de envero, las bayas de vid cambian el mecanismo de descarga floemático, pasando de ser simplástico a ser apoplástico (Zhang et al. 2006). En este sentido, una vez que la sacarosa es descargada al espacio apoplástico es desdoblada por una invertasa de pared celular (cwINVs) para producir glucosa y fructosa (Zhang et al. 2006, Figura 6.1). Las diferencias observadas en las concentraciones de sacarosa en envero como en post-envero entre ABA y el control no pueden ser explicadas por la expresión de la *VvcwINV* ni por la expresión de *VvSUC12*. Lo contrario ocurre entre los tratamientos GA₃ y el control, en donde si bien no se observaron modificaciones en la concentración de sacarosa en ningún momento fenológico estudiado, sí se registraron modificaciones en los niveles de expresión de los genes *VvcwINV* y *VvSUC12*. En relación a lo explicado anteriormente, debe existir otro mecanismo que esté regulando la concentración de sacarosa en bayas de plantas de vid.

Una vez desdoblada la sacarosa en el espacio apoplástico por la acción de cwINVs, la glucosa y fructosa es acumulada en el interior de las vacuolas de las células del mesocarpo mediante transportadores de hexosas (Figura 6.1). De los genes analizados: *VvHT1*, *VvHT2*, *VvHT3*, *VvHT5* y *VvHT6*, los que presentaron un mayor nivel de expresión a lo largo del desarrollo de la baya y, por lo tanto, tendrían un rol preponderante en la acumulación de hexosas fueron: *VvHT2*, *VvHT3* y *VvHT6*. En este sentido, la mayor expresión de estos genes dado por ABA en el estadio fenológico de envero, sugieren una estimulación de la descarga floemática en las bayas. Asumiendo una correlación entre el área del floema y el número de tubos cribosos (Canny 1973), el mayor área de floema en hojas, tallos y pedicelos de bayas sería una de las causas del mayor flujo de fotoasimilados desde las hojas hacia las bayas. Esto, en conjunto con la sobre-expresión de los genes que codifican para transportadores de hexosas, serían los responsables del adelantamiento de la maduración de las plantas tratadas con ABA. El incremento en el área de floema en las plantas aplicadas con ABA se corresponden con los resultados observados por Travaglia et al. (2012), quienes encontraron que las conexiones floemáticas en ovarios de flores de maíz fueron incrementadas con la aplicación de dicha fitohormona. Contrariamente, otros investigadores han encontrado efectos negativos en relación al ABA y el desarrollo vascular. En este sentido, Popko et al. (2010) sugirió que el ABA inhibe el desarrollo y crecimiento de los tejidos vasculares por una disminución en la expresión de genes que codifican para acuaporinas, por una reducción en la concentración de auxinas en los tallos o interfiriendo en la señalización de esta hormona. Asimismo, Gimeno-Gilles et al. (2009) postularon que ABA inhibiría el crecimiento de xilema y floema debido a

que esta hormona inhibe la hidrólisis de varios polímeros de pared celular, que es un pre-requisito para la expansión celular.

En relación a las aplicaciones con GA_3 , también se registró un incremento en el área de floema en hojas, tallos y pedicelos de bayas. Sin embargo, GA_3 estimuló la localización de carbono en tallos en lugar de bayas. En este sentido, parecería ser que dicho regulador de crecimiento previno el flujo de carbono a las bayas en envero, disminuyendo la expresión de los genes transportadores de hexosas como *VvHT2*, *VvHT3* y *VvHT6*. Es por ello que se observó un retraso en el inicio de la maduración de 5 días con respecto al control. Sin embargo, este tratamiento registró los mayores contenidos de glucosa y fructosa a cosecha (post-envero). Esto se correlacionó con la sobre-expresión de los genes *VvHT2* y *VvHT3* en post-enevero.

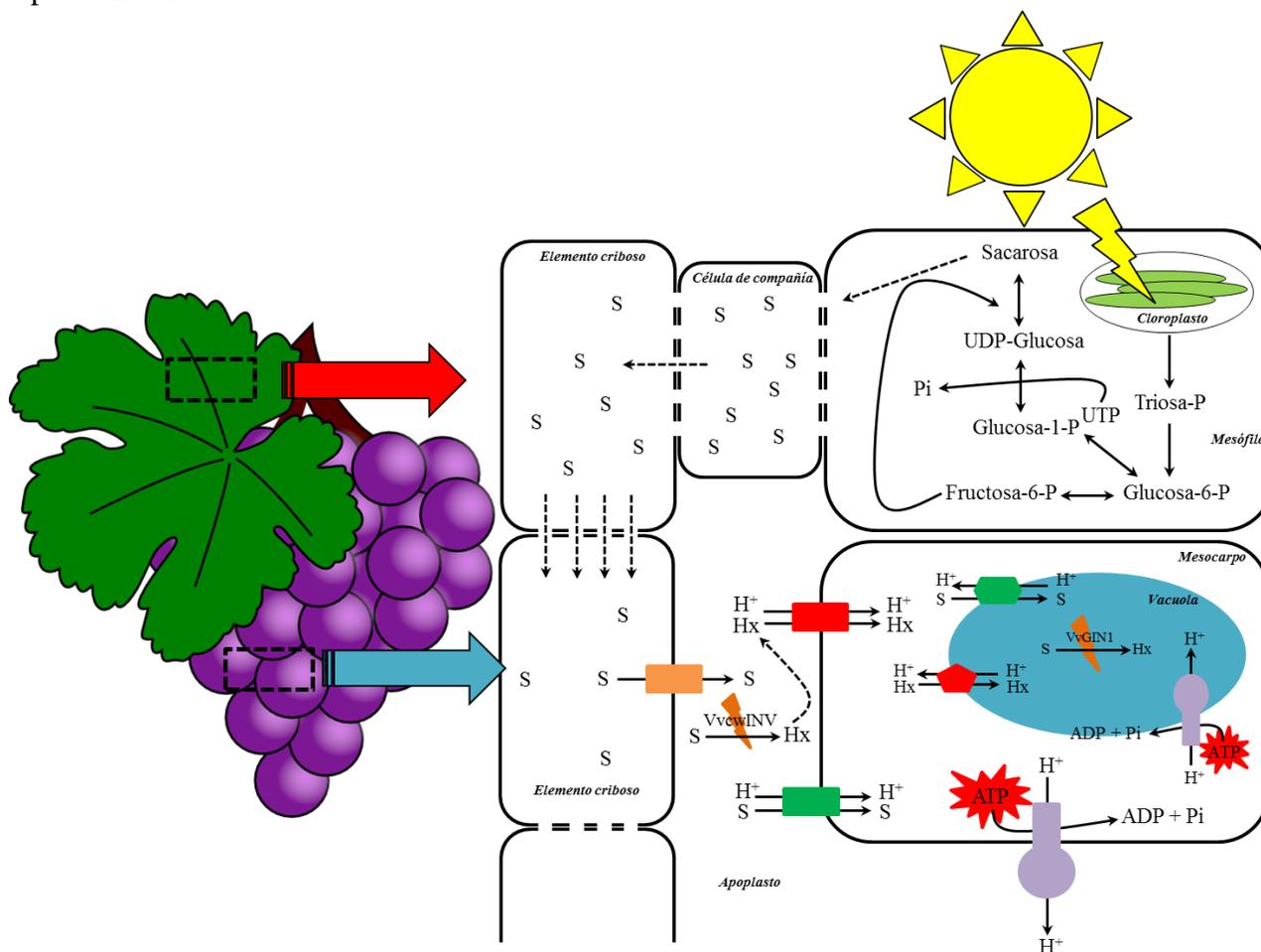


Figura 6.1. Modelo de transporte de carbono en plantas de vid a partir del inicio de la maduración (envero). S: sacarosa; Pi: fosfato inorgánico; Hx: hexosas; VvcwINV: enzima invertasa de pared celular; VvGIN1: enzima invertasa vacuolar.

6.2 Conclusiones y perspectivas futuras

La aplicación exógena de ABA y GA₃ regulan el inicio de la maduración de las bayas, modificando la concentración de carbohidratos no estructurales en hojas, la expresión de transportadores de azúcares y el área del floema. ABA y GA₃ estimularon la carga floemática manteniendo elevada la concentración de sacarosa en las hojas en el momento de máxima acumulación de azúcares en las bayas (envero). Asimismo, el ABA incrementó la fuerza como destino de los frutos mediante la sobre-expresión de los genes *VvHT2*, *VvHT3* y *VvHT6* que codifican para transportadores de hexosas. Las aplicaciones con los reguladores de crecimiento, a dosis fisiológicas, promovieron el crecimiento del área de floema y xilema en hojas adultas, tallos y pedicelos de las bayas, incrementando la capacidad estructural del transporte de fotoasimilados. Por otro lado, aunque GA₃ mostró el mismo patrón que ABA en el desarrollo del floema, la regulación en el transporte de fotoasimilados desde las hojas hacia las bayas estuvo dada por la expresión de los genes transportadores de hexosas. En este sentido, en enero, la mayor cantidad de fotoasimilados fue destinado a los tallos para la formación de pared, que se correlacionó con una baja expresión de los genes *VvHT2*, *VvHT3* y *VvHT6* en bayas. Contrariamente, en post-enero, la mayor cantidad de fotoasimilados fue destinada a bayas, que se correlacionó con una sobre-expresión de los genes *VvHT2* y *VvHT3*.

Teniendo en cuenta la carga floemática activa, mediada por transportadores, son necesarias más investigaciones para dilucidar la importancia de éste tipo de transporte. Como primer paso se tendrían que analizar las concentraciones de proteínas y verificar si se correlacionan con los niveles de expresión génica. Es posible que la regulación de los transportadores, mediada por los reguladores de crecimiento, sea post-transcripcional y por ello no se observan cambios a nivel de expresión génica. En un segundo paso, se tendría que determinar la localización subcelular de los transportadores de azúcares. Cabe la posibilidad de que éstos no actúen en la carga floemática, sino que cumplan una función de regulación de la concentración de carbohidratos a nivel de citoplasma u organela. Es decir, puede que estén actuando en el transporte intracelular, transportando los azúcares del citoplasma hacia las organelas o viceversa.

Por otro lado, son necesarias más investigaciones para dilucidar el efecto de los reguladores de crecimiento sobre la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios en vid. Asimismo, sería conveniente continuar con los estudios a nivel de precursores, como por ejemplo aminoácidos, para determinar los mecanismos que gobiernan la síntesis de los metabolitos secundarios.

Los resultados obtenidos en la presente tesis son de importancia para entender el mecanismo de transporte de carbono y su regulación en un cultivo de gran valor económico como es la vid. Asimismo, las aplicaciones con ABA en cultivos de vid de variedades viníferas podrían ser usadas como herramienta tecnológica en la industria vitivinícola. En este sentido, el adelantamiento en la maduración provocada por ABA podría ser de ayuda para evitar enfermedades criptogámicas como la podredumbre de los racimos. En Mendoza, el régimen de lluvias es monzónico por lo que las precipitaciones se concentran durante los meses de febrero y marzo, coincidentes con la vendimia de la mayoría de las variedades. Debido a la presencia de agua libre y temperaturas elevadas, el complejo etiológico causal de la podredumbre de los racimos se desarrolla rápidamente generando grandes pérdidas a cosecha. Es por ello que una vendimia temprana, dado por el adelantamiento de la maduración, podría

disminuir los costos de aplicación de fungicidas o inclusive evitarlos. Además, hay regiones en Mendoza, como el Valle de Uco, en donde algunas variedades de ciclo largo como Bonarda y Cabernet Sauvignon no llegan a cosecha con el tenor azucarino deseado por ser una zona relativamente fría desde el punto de vista de los requerimientos de la vid. En este caso, aplicaciones con ABA ayudarían a que las bayas de estas variedades adelanten su maduración, acortando su ciclo, y de esta manera llegar a los grados Brix requeridos por las bodegas.

Capítulo 7: Bibliografía citada

- Aach, H., Bode, H., Robinson, D. G., Graebe, J. E. 1997. *ent*-Kaurene synthase is located in proplastids of meristematic shoot tissues. *Planta* 202: 211-219
- Adams, D.O. 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 249-256
- Afoufa-Bastien, D., Medici, A., Jeauffre, J., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Atanassova, R., Laloi, M. 2010. The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and microarray expression profiling. *BMC Plant Biology* 10: 245-271
- Ageorges, A., Issaly, N., Picaud, S., Delrot, S. 2000. Characterization of an active sucrose transporter gene expressed during the ripening of grape berry (*Vitis vinifera* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 177-185
- Agrawal, G.K., Yamazaki, M., Kobayashi, M., Hirochika, R., Miyao, A., Hirochika, H. 2001. Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon *Tos17* insertion: tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel *OsTATC* gene. *Plant Physiology* 125: 1248-1257
- Akaba, S., Leydecker, M.T., Moureaux, T., Oritani, T., Koshiba, T. 1998. Aldehyde oxidase in wild type and *aba1* mutant leaves of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant and Cell Physiology* 39: 1281-1286
- Albone, K.S., Gaskin, P., Macmillan, J., Phinney, B.O., Willis, C.L. 1990. Biosynthetic origin of gibberellin A3 and gibberellin A7 in cell-free preparations from seeds of *Marah macrocarpus* and *Malus domestica*. *Plant Physiology* 94: 132-142
- Aloni, R. 2001. Foliar and axial aspects of vascular differentiation: hypotheses and evidence. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 22-34
- Alonso, R., Berli, F.J., Bottini, R., Piccoli, P. 2015. Plant Physiology and Biochemistry Acclimation mechanisms elicited by sprayed abscisic acid, solar UV-B and water deficit in leaf tissues of field-grown grapevines. *Plant Physiology and Biochemistry* 91: 56-60
- An, F., Zhang, X., Zhu, Z., Ji, Y., He, W., Jiang, Z., Li, M., Guo, H. 2012. Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Cell Research* 22: 915-927
- Appleford, N.E.J., Evans, D.J., Lenton, J.R., Gaskin, P., Croker, S.J., Devos, K., Phillips, A.L., Hedden, P. 2006. Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat. *Planta* 223: 568-582
- Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T.A., Lawrenson, T., Sablowski, R., Østergaard, L. 2010. Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 24: 2127-2132

- Avigad, G. 1982. Sucrose and other disaccharides. Pp. 216-347 en Loewus, F.A., Tanner, W. (eds.) Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Springer-Verlag, New York
- Bai, M.Y., Shang, J.X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T.P., Wang, Z.Y. 2012. Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. *Nature Cell Biology* 14: 810-817
- Ban, T., Ishimaru, M., Kobayashi, S., Shiozaki, S., Goto-Yamamoto, N., Horiuchi, S. 2003. Abscisic acid and 2,4-dichloroethoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in 'Kyoho' grapeberries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78: 586-589
- Bartolozzi, F., Bertazza, G., Bassi, D., Cristoferi, G. 1997. Simultaneous determination of soluble sugars and organic acids as their trimethylsilyl derivatives in apricot fruits by gas-liquid chromatography. *Journal of chromatography A* 758: 99-107
- Basha, S.M., Katam, R., Vasanthaiah, H., Matta, F. 2009. Proteome analysis of muscadine grape leaves. *International Journal of Wine Research* 1:161-173
- Basha, S.M., Katam, R., Vasanthaiah, H., Matta, F. 2009. Proteome analysis of muscadine grape leaves. *International Journal of Wine Research* 1:161-173
- Bastián, F. 2000. Producción de fitohormonas por bacterias endofíticas y su influencia en el contenido de azúcares en sorgo azucarado. Tesis de doctorado Universidad Nacional de Río Cuarto
- Bastián, F., Rapparini, F., Baraldi, R., Piccoli, P., Bottini, R. 1999. Inoculation with *Acetobacter diazotrophicus* increases glucose and fructose content in shoots of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Symbiosis* 27: 147-156
- Bazzaz, F.A., Chiariello, N.R., Coley, P.D., Pitelka, L.F. 1987. Allocating resources to reproduction and defence. *Bioscience* 37: 58-67
- Beckett, M., Loreto, F., Velikova, V., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Tattini, M., Calfapietra, C., Farrant, J. 2012. Photosynthetic limitations and volatile and non-volatile isoprenoids in the poikilochlorophyllous resurrection plant *Xerophyta humilis* during dehydration and rehydration. *Plant, Cell and Environment* 35: 2061-2074
- Berli, F., D'Angelo, J., Cavagnaro, B., Bottini, R., Wuilloud, R., Silva, M.F., 2008. Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 2892-2898
- Berli, F., Moreno, D., Piccoli, P., Hespanhol-Viana, L., Silva, M.F., Bressan-Smith, R., Cavagnaro, J.B., Bottini, R. 2010. Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing

- ultraviolet- absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant Cell and Environment* 33: 1-10
- Bethke, P., Schuurink, R., Jones, R. 1997. Hormonal signaling in cereal aleurone. *Journal of Experimental Botany* 48: 1337-1356
- Bewley, J.D. y Black, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. Bewley, J.D., Black, M. (eds.). Plenum Press, London
- Bhalerao, R.P. y Bennett, M.J. 2003. The case for morphogens in plants. *Nature Cell Biology* 5: 939-943
- Bialeski, R.L. 1982. Sugar alcohols. Pp. 158-192 en Loewus, A., Tanner, W. (eds.) *Encyclopedia of plant physiology, New Series, vol. 13, part A. Plant carbohydrates*. Springer, Berlin
- Bitsch, R., Netzel, M., Frank, T., Strass, G., Bitsch, I. 2004. Bioavailability and biokinetics of anthocyanins from red grape juice and red wine. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2004: 293-298
- Björklund, S., Antti, H., Uddestrand, I., Moritz, T., Sundberg, B. 2007. Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *The Plant Journal* 52(3): 499-511
- Boss, P.K. y Davies, C. 2001. Molecular biology of sugar and anthocyanin accumulation in grape berries. Pp. 1-33 en Roubelakis-Angelakis, K.A. (ed.) *Molecular biology and biotechnology of the grapevine*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Bottini, R., Cassán, F., Piccoli, P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 497-503
- Boyer, G.L. y Zeevaart, J.A.D. 1982. Isolation and quantitation of β -D-glucopyranosyl abscisate from leaves of *Xanthium* and spinach. *Plant Physiology* 70: 227-31
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 7: 248-254
- Brady, C.J. 1987. Fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 155-178
- Brault, M., Amiar, Z., Pennarun, A.-M., Monestiez, M., Zhang, Z., Cornel, D., Dellis, O., Knight, H., Bouteau, F., Rona, J.-P. 2004. Plasma membrane depolarization induced by ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation which are both Ca^{2+} dependent. *Plant Physiology* 135: 231-243

- Brian, P.W., Grove, J.F., Mulholland, T.P.C. 1967. Relationships between structure and growth-promoting activity of gibberellins and some allied compounds in 4 test systems. *Phytochemistry* 6: 1475-1499
- Burbidge, A., Grieve, T.M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D.R., Taylor, I.B. 1999. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *vp14*. *The Plant Journal* 17: 427-431
- Büttner, M. 2007. The monosaccharide transporter-like gene family in Arabidopsis. *FEBS Letters* 581: 2318-2324
- Büttner, M. 2007. The monosaccharide transporter-like gene family in Arabidopsis. *FEBS Letters* 581: 2318-2324
- Çakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., Atanassova, R. 2003. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signalling. *The Plant Cell* 15: 2165-2180
- Canny, M. 1973. Phloem translocation. Pp. 144-149 en Reidel, B.V.D. (ed.) *The proportion of sieve elements in the phloem*. Cambridge University Press, London
- Carlsbecker, A. y Helariutta, Y. 2005. Phloem and xylem specification: pieces of the puzzle emerge. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 512-517
- Cheikh, N., Brenner, M.L., Huber, J.L., Huber, S.C. 1992. Regulation of sucrose phosphate synthase by gibberellins in soybean and spinach plants. *Plant Physiology* 100: 1238-1242
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J.P., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M.J., Genschik, P., Achard, P. 2011. DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in Arabidopsis. *The Plant Cell* 23: 1849-1860
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., Peng, J. 2004. Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131: 1055-1064
- Cheng, W.-H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.-C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T., Sheen, J. 2002. A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell* 14: 2723-2743
- Chernys, J.T. y Zeevaart, J.A.D. 2000. Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiology* 124: 343-353
- Choat, B., Drayton, W.M., Brodersen, C., Matthews, M.A., Shackel, K.A., Wada, H., McElrone, A.J. 2010. Measurement of vulnerability to water stress-induced cavitation

- in grapevine: a comparison of four techniques applied to a long-vesseled species. *Plant, Cell and Environment* 33:1502-1512
- Choi, H., Park, H.J., Park, J.H., Kim, S., Im, M.Y., Seo, H.H., Kim, Y.W., Hwang, I., and Kim, S.Y. 2005. Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiology* 139: 1750-1761
- Conde, A., Chaves, M.M., Gerós, H. 2011 a. Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. *Plant and Cell Physiology* 52: 1583-1602
- Conde, A., Regalado, A., Rodrigues, D., Costa, J.M., Blumwald, E., Chaves, M.M., Gerós, H. 2014. Polyols in grape berry: transport and metabolic adjustments as a physiological strategy for water-deficit stress tolerance in grapevine. *Journal of experimental botany* 66(3): 889-906
- Conde, C., Agasse, A., Glissant, D., Tavares, R.M., Gerós, H., Delrot, S. 2006. Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. *Plant Physiology* 141: 1563-1577
- Conde, C., da Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., Gerós, H. 2007. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food* 1: 1-22
- Coombe, B. 1992. Research on the development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture* 43: 101-110
- Coombe, B.G. y McCarthy, M.G. 2000. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 131-135
- Cornforth, J.W., Milborrow, B.V., Ryback, G. 1965. Chemistry and Physiology of 'Dormins' In Sycamore: Identity of Sycamore 'Dormin' with Abscisin II. *Nature* 205: 1269-1270
- Cosgrove, D.J. 1997. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell* 9: 1031-1041
- Cowan, A.K. 2000. Is abscisic aldehyde really the immediate precursor to stress-induced ABA? *Trends in Plant Science* 5: 191-192
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. 2000. Natural products. Pp. 1250-1318 en Buchanan, B., Grisse, W., Jones, R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD
- Daie, J. 1987. Interaction of cell turgor and hormones on sucrose uptake in isolated phloem of celery. *Plant Physiology* 84: 1033-1037
- Davière, J. y Achard, P. 2013. Gibberellin signaling in plants. *Development* 140: 1147-1151

- Davies, C., Robinson, S.P. 1996. Sugar accumulation in grape berries. Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues. *Plant Physiology* 111: 275-283
- Davies, C., Wolf, T., Robinson, S.P. 1999. Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues. *Plant Science* 147: 93-100
- Davies, P.J. 2009. *Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Dayan, J., Schwarzkopf, M., Avni, A., Aloni, R. 2010. Enhancing plant growth and fiber production by silencing GA 2-oxidase. *Plant Biotechnology Journal* 8: 425-435
- Dayan, J., Voronin, N., Gong, F., Sun, T.P., Hedden, P., Fromm, H., Aloni, R. 2012. Leaf-induced gibberellin signaling is essential for internode elongation, cambial activity, and fiber differentiation in tobacco stems. *The Plant Cell* 24: 66-79
- de Bolt, S., Cook, D.R., Ford, C.M. 2006. L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 5608-5613
- de Lucas, M., Davière, J. M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias- Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E., Prat, S. 2008. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451: 480-484
- De Nisco, M., Manfra, M., Bolognese, A., Sofo, A., Scopa, A., Tenore, G.C., Pagano, F., Milite, C., Russo, M.T. 2013. Nutraceutical properties and polyphenolic profile of berry skin and wine of *Vitis vinifera* L. (cv. Aglianico). *Food Chemistry* 140(4): 623-9
- Degenhardt, J., Kollner, T.G., Gershenzon, J. 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70: 1621-1637
- Delrot, S. 1994. Assimilate translocation and membrane transport as limiting factors for plant growth. In Smith, C.J., Gallan, J., Chiatante, D., Zocchi, G. (eds.) *Biochemical mechanisms involved in growth regulation*. Oxford University Press, New York
- Delrot, S., Atanassova, R., Gomès, E., Coutos-Thévenot, P. 2001. Plasma membrane transporters: a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Science* 161: 391-404
- Deluc, L.G., Grimplet, J., Wheatley, M.D., Tillet, R.L., Quilici, D., Osborne, C., Schlauch, K.A., Schooley, D.A., Cushman, J.C., Cramer, G.R. 2007. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* 8: 429
- Demura, T., y Ye, Z.H. 2010. Regulation of plant biomass production. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 299-304

- Deuschle, K., Funk, D., Forlani, G., Stranski, H., Biehl, A., Leister, D., van der Graaff, E., Kunze, R., Frommer, W.B. 2004. The role of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *The Plant Cell* 16: 3413-3425
- Di Carli, M., Zamboni, A., Pé, M.E., Pezzotti, M., Lilley, K.S., Benvenuto, E., Desiderio, A. 2010. Two-Dimensional Differential in Gel Electrophoresis (2D-DIGE) Analysis of Grape Berry Proteome during Postharvest Withering. *Journal of proteome Research* 10: 429-446
- Dias, A.C.P. 2003. The potential of in vitro cultures of *Hypericum perforatum* and *Hypericum androsaemum* to produce interesting pharmaceutical compounds. Pp. 137-155 en Ernest, E. (ed.) *The Genus Hypericum*. Harwood Academic Publishers, UK
- Dietz, K.J., Sauter, A., Wichert, K., Messdaghi, D., Hartung, W. 2000. Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *Journal of Experimental Botany* 51: 937-944
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., Sun, T.P. 2004. The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *The Plant Cell* 16: 1392-1405
- Dinant, S. y Lemoine, R. 2010. The phloem pathway: new issues and old debates. *Comptes Rendus Biologies* 333: 307-19
- Dood, I.C. y Davies, W.J. 2005. Hormones and the regulation of the water balance. Pp. 493-512 en Davies, P.J. (ed.) *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academics Publishers, Dordrecht.
- Dry, P.R., Loveys, B.R., Düring, H. 2000. Partial drying of the rootzone of grape. I. Transient changes in shoot growth and gas exchange. *Vitis* 39: 3-7
- Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology* 135: 1893-1902
- Dumbroff, E.B., Cohen, D.B., Webb, D.P. 1979. Seasonal levels of abscisic acid in buds and stems of *Acer saccharum*. *Physiologia Plantarum* 45: 211-214
- Echeverría, E. y Humphreys, T. 1985. Glucose control of sucrose synthase in the maize scutellum. *Phytochemistry* 24: 2851-2855
- Eriksson, M.E., Israelsson, M., Olsson, O., Moritz, T. 2000. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nature Biotechnology* 18: 784-788
- Escoriaza, G., Sansberro, P., García Lampasona, S., Gatica, M., Bottini, R., Piccoli, P. 2013. In vitro cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay synthesize the phytoalexin nerolidol upon infection by *Phaeoacremonium parasiticum*. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 289-297

- Ezcurra, I., Wycliffe, P., Nehlin, L., Ellerstrom, M., Rask, L. 2000. Transactivation of the Brassica napus napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements: B2 mediates activation through an ABRE, whereas B3 interacts with an RY/G-box. *The Plant Journal* 24: 57-66
- Facchini, P. y Chappell, J. 1992. Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89: 11088-11092
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J. M., Kircher, S., Schäfer, E., Fu, X., Fan, L.M., Deng, X.W. 2008. Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature* 451: 475-479
- Feurtado, J.A., Huang, D., Wicki-Stordeur, L., Hemstock, L.E., Potentier, M.S., Tsang, E.W., Cutler, A.J. 2011. The Arabidopsis C2H2 zinc finger INDETERMINATE DOMAIN1/ENHYDROUS promotes the transition to germination by regulating light and hormonal signaling during seed maturation. *The Plant Cell* 23: 1772-1794
- Fidan, Y., Çelik, S., Tamer, M. 1981. Effect of gibberellic acid and of ringing on the accumulation of cellulose in the pedicel and stem of table grape varieties. *Vignevine* 8: 35-39
- Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Romieu, C., Delrot, S. 1999. Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiology* 120: 1083-1093
- Finkelstein, R.R. y Rock, C.D. 2002. Abscisic acid biosynthesis and response. Pp. 1-48 en Somerville, C.R. y Meyerowitz, E.M. (eds.) *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists: Rockville, MD.
- Flexas, J., Barón, M., Bota, J., Ducruet, J.-M., Gallé, A., Galmés, J., Jiménez, M., Pou, A., Ribas-Carbó, M., Sajnani, C. 2009. Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted Vitis hybrid Richter-110 (*V. berlandieri* × *V. rupestris*). *Journal of Experimental Botany* 60: 2361-2377
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B., Medrano, H. 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* 29: 461-471
- Flexas, J., Galmés, J., Gallé, A., Gulias, J., Pou, A., Ribas-Carbó, M., Tomàs, M., Medrano, H. 2010. Improving water use efficiency in grapevines: potential physiological targets for biotechnological improvement. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16: 106-121
- Fontana, A.R. y Bottini, R. 2014. High-throughput method based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe followed by liquid chromatography-multi-wavelength

- detection for the quantification of multiclass polyphenols in wines. *Journal of Chromatography A* 16: 1342-1344
- Fu, X., Richards, D.E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., Harberd, N.P. 2004. The Arabidopsis mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *The Plant Cell* 16: 1406-1418
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., and Yamagushi-Shinozaki, K. 2006. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 1988-1993
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E.G., Grau-Enguix, F., Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S.G., Alabadí, D., Blázquez, M.A. 2012. Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 109: 13446-13451
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E.G., Marín, J.A., Prat, S., Blázquez, M.A., Alabadí, D. 2010. Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in Arabidopsis. *Molecular Biology and Evolution* 27: 1247-1256
- Gamalei, Y. 1989. Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. *Trees* 3: 96-110
- Gamalei, Y. 1991. Phloem loading and its development related to plant evolution from trees to herbs. *Trees* 5: 50-64
- Geiger, D. y Servaites, J. 1991. Carbon allocation and Response to stress. Pp. 103-127 en Mooney, H.A., Winner, W.E., Pell, E.J. (eds.) *Response of Plants to Multiple Stresses*. Academic Publishers, San Diego
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., Romeis, T., Hedrich, R. 2010. Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107: 8023-8028
- Genard, M., Dauzat, J., Franck, N., Lescourret, F., Moitrier, N., Vaast, P., Vercambre, G. 2008. Carbon allocation in fruit trees: from theory to modelling. *Trees* 22: 269-282
- Gil, M., Pontin, M., Berli, F., Bottini, R., Piccoli, P. 2012. Metabolism of terpenes in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf tissues to UV-B radiation. *Phytochemistry* 77: 89-98
- Gillard, D.F. y Walton, D.C. 1976. Abscisic acid metabolism by a cell-free preparation from *Echinocystis lobata* liquid endosperm. *Plant Physiology* 58: 790-795
- Gimeno-Gilles, C., Lelièvre, E., Viau, L., Malik-Ghulam, M., Ricoult, C., Niebel, A., Leduc, N., Limami, A.M. 2009. ABA-Mediated Inhibition of Germination Is Related to the

- Inhibition of Genes Encoding Cell-Wall Biosynthetic and Architecture: Modifying Enzymes and Structural Proteins in *Medicago truncatula* Embryo Axis. *Molecular Plant* 2(1): 108-119
- Giribaldi, M., Gény, L., Delrot S., Schubert A. 2010. Proteomic analysis of the effects of ABA treatments on ripening *Vitis vinifera* berries. *Journal of Experimental Botany* 61: 2447-2458
- Giribaldi, M., Perugini, I., Sauvage, F.X., Shubert, A. 2007. Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. *Proteomics* 7: 3154-3170
- Godt, D.E. y Roitsch, T. 1997. Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three ex- tracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiology* 115: 273-282
- Grassmann, J., Hippeli, S., Elstner, E.F. 2002. Plant's defense and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 471-478
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S. J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P., Thomas, S.G. 2006. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18: 3399-3414
- Guldan, S.J. y Brun, W.A. 1987. Effect of abscisic acid on amino acid uptake and efflux in developing soybean seeds. *Crop Science* 27: 716-719
- Hackel, A., Schauer, N., Carrari, F., Fernie, A.R., Grimm, B., Kühn ,C. 2006. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *The Plant Journal* 45: 180-192
- Hagenimana, V., Vezine, L.P. and Simard, R.E. 1994. Sweet potato α - and β -amylase: Characterization and kinetic studies with endogenous inhibitors. *Journal of Food Science* 2: 373-377
- Hampel, D., Mosandl, A., Wüst, M., 2005. Induction of de novo volatile terpene biosynthesis via cytosolic and plastidial pathways by methyl jasmonate in foliage of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2652-2657
- Hardie, W.J. 2000. Grapevine biology and adaptation to viticulture. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 74-81
- Harmon, A.C., Gribskov, M., Harper, J.F. 2000. CDPKs -a kinase for every Ca^{2+} signal? *Trends in Plant Science* 5: 154-159
- Hartung, W. y Davies, W.J. 1991. Drought-induced changes in physiology and ABA. Pp. 63-79 en Davies, W.J., Jones, H.G. (eds.) *Abscisic acid-Physiology and Biochemistry*. Bios Scientific Publishers, Oxford

- Hartung, W., Sauter, A., Hose, E. 2002. Abscisic acid in the xylem: Where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany* 53: 27-32
- Hauser, F., Waadt, R., Schroeder, J.I. 2011. Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Current Biology* 21: R346-55
- Hawker, J.S. 1969. Changes in the activities of malic enzyme, malic dehydrogenase, phosphopyruvate carboxylase and pyruvate decarboxylase during the development of a non-climacteric fruit (the grape). *Phytochemistry* 8: 19-23
- Hayes, M., Davies, C., Dry, I. 2007. Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. *Journal of Experimental Botany* 58: 1985-1997
- Hayes, M., Feechan, A., Dry, I. 2010. Involvement of Abscisic Acid in the Coordinated Regulation of a Stress-Inducible Hexose Transporter (*VvHT5*) and a Cell Wall Invertase in Grapevine in Response to Biotrophic Fungal Infection. *Plant Physiology* 153: 211-221
- Hedden, P. 1997. The oxidases of gibberellin biosynthesis: their function and mechanism. *Physiologia Plantarum* 101: 709-719
- Hedden, P. y Phillips, A. L. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* 5: 523-530
- Hedden, P. y Thomas, S. G. 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *The Biochemical journal* 444: 11-25
- Helliwell, C.A., Sullivan, J.A., Mould, R.M., Gray, J.C., Peacock, W.J. y Dennis, E.S. 2001. A plastid envelope location of Arabidopsis ent-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *The Plant Journal* 28: 201-208
- Henschke, P.A. y Jiranek, V. 1993. Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. Pp. 77-164 en Fleet, G.H. (ed.) *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland
- Ho, L.C. 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 355-378
- Hong, G.J., Xue, X.Y., Mao, Y.B., Wang, L.J., Chen, X.Y. 2012. Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *The Plant Cell* 24: 2635-2648
- Hornsey, I.S. 2007. *Chemistry and biology of winemaking*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge

- Hou, X., Lee, L.Y., Xia, K., Yan, Y., Yu, H. 2010. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Developmental Cell* 19: 884-894
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., Yamaguchi, J. 2001. slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *The Plant Cell* 13: 999-1010
- Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Sentoku, N., Kitano, H., Matsuoka, M., Kobayashi, M. 2001. Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 β -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 98: 8909-8914
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal* 27: 325-333
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi, K., Shinozaki, K. 2000. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiology* 123: 553-562
- Jaillon, O., Aury, J.M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Huguency, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyere, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pe, M.E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.F., Weissenbach, J., Quetier, F., Wincker, P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463-467
- Jammes, F., Song, C., Shin, D., Munemasa, S., Takeda, K., Gu, D., Cho, D., Lee, S., Giordo, R., Sritubtim, S., Leonhardt, N., Ellis, B.E., Murata, Y., Kwak, J.M. 2009. MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 20520-5
- Jenkins, P.A. y Shepherd, K.R. 1974. Seasonal changes in levels of indole-acetic acid and abscisic acid in stem tissues of *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Botany* 4: 511-519
- Jeong, S.T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S., Esaka, M. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* 167: 247-252

- Jiang, C. y Fu, X. 2007. GA action: turning on de-DELTA repressing signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 461-5
- Jin, S., Kanagaraj, A., Verma, D., Lange, T., Daniell, H. 2011. Release of hormones from conjugates: chloroplast expression of beta-glucosidase results in elevated phytohormone levels associated with significant increase in biomass and protection from aphids or whiteflies conferred by sucrose esters. *Plant Physiology* 155: 222-235
- Johnson, D.A., Hill, J.P., Thomas, M.A. 2006. The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages. *BMC Evolutionary Biology* 6: 64
- Josse, E.M., Gan, Y., Bou-Torrent, J., Stewart, K.L., Gilday, A.D., Jeffree, C.E., Vaistij, F. E., Martínez-García, J.F., Nagy, F., Graham, I.A., Halliday, K.J. 2011. A DELTA in disguise: SPATULA restrains the growth of the developing Arabidopsis seedling. *The Plant Cell* 23: 1337-1351
- Kaitaniemi, P. y Honkanen, T. 1996. Simulating source-sink control of carbon and nutrient translocation in a modular plant. *Ecological Modelling* 88: 227-240
- Kalil, G.P.C., Terra, M.M., Kalil Filho, A.N., Macedo, J.L.V., Pires, E.J.P. 1999. Anelamento e ácido giberálico na frutificação da uva 'Maria' sem sementes. *Scientia Agricola, Piracicaba* 56(2): 317-328
- Kanellis, A.K. y Roubelakis-Angelakis, K.A. 1993. Grape. Pp. 189-234 en Seymour, G., Taylor, J., Tucker, G. (eds.) *Biochemistry of fruit ripening*. Chapman and Hall, London
- Kang, J., Hwang, J.U., Lee, M., Kim, Y.Y., Assmann, S.M., Martinoia, E., Lee, Y. 2010. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107: 2355-2360
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. 2002. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 45188-45194
- Keller, M. 2010. *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology*, 2nd Edn, Elsevier (ed.) CA Elsevier Inc Publishers, San Diego
- Kennedy, J.A., Saucier, C., Glories, Y. 2006. Grape and wine phenolics: History and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 239-248
- Kinet, J.M. 1993. Environmental, chemical and genetic control of flowering. *Horticultural Reviews* 15: 279-334

- Kliewer, W.M. 1965. Changes in the concentration of malates, tartrates, and total free acids in flowers and berries of *Vitis vinifera*. American Journal of Enology and Viticulture 16: 92
- Kliewer, W.M. 1966. Sugar and organic acids of *Vitis vinifera*. Plant Physiology 41: 923-931
- Kobayashi, M., Gaskin, P., Spray, C., Phinney, B., MacMillan, J. 1994. The metabolism of gibberellin A₂₀ to gibberellin A₁ by tall and dwarf mutants of *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 106: 1367-1372
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N., Yoshioka, H. 2007. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. The Plant Cell 19: 1065-1080
- Koch, K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. Current Opinion in Plant Biology 7: 235-246
- Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhous-van der Swan, D.L.C., Karssen, C.M. 1982. The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germination gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Theoretical and Applied Genetics 61: 385-393
- Krochko, J.E., Abrams, G.D., Loewen, M.K., Abrams, S.R., Cutler, A.J. 1998. Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. Plant Physiology 118: 849-860
- Kühn, C., Barker, L., Bürkle, L., Frommer, W.B. 1999. Update on sucrose transport in higher plants. Journal of experimental Botany 50: 935-953
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., Shinozaki, K. 2010. ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 107: 2361-2366
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., Nambara, E. 2004. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. The EMBO Journal 23: 1647-1656
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., Nambara, E. 2004. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. The EMBO Journal 23: 1647-1656
- Laby, R.J., Kincaid, M.S., Kim, D., Gibson, S.I. 2000. The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. The Plant Journal 23: 587-596

- Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T., Genschik, P. 2006. F-box proteins everywhere. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 631-638
- Lee, K.H., Piao, H.L., Kim, H.Y., Choi, S.M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J.M., Lee, I.J. 2006. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126: 1109-1120.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., Peng, J. 2002. Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is upregulated following imbibition. *Genes & Development* 16: 646-658
- Lee, S.C., Lan, W., Buchanan, B.B., Luan, S. 2009. A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 21419-21424
- Lehmann H. y Vlasov, P. 1988. Plant growth and stress—the enzymic hydrolysis of abscisic acid conjugate. *Journal of Plant Physiology* 132: 98-101
- Léon-Kloosterziel, K.M., Alvarez-Gil, M., Ruijs, G.J., Jacobsen, S.E., Olszewski, N.E., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D., Koornneef, M. 1996. Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. *The Plant Journal* 10: 655-661
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M. 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters* 400: 271-274
- Lima, M.R.M., Guimarães, O., Ferreres, F., Dias, A.C.P. 2004. Changes in phenolic production of *Vitis vinifera* cell cultures induced by *Phaeoemoniella chlamydospora* elicitation. *Actas do 4º Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*, pp 32-35
- Little, C.H.A., Wareing, P.F. 1981. Control of cambial activity and dormancy in *Picea sitchensis* by indol-3-ylacetic acid and abscisic acids. *Canadian Journal of Botany* 59: 1480-1493
- Loewus, F. 1999. Biosynthesis and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants and of Analogs of Ascorbic Acid in Fungi. *Phytochemistry* 52(2): 193-210
- Long, S.P., Ainsworth, E.A., Rogers, A., Ort, D.R. 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annual Review of Plant Biology* 55: 591-628
- Lu, C., Han, M.H., Guevara-Garcia, A., Fedoroff, N.V. 2002. Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 15812-15817
- Lü, Y., Zhang, D., Yan, H. 1999. Sugar unloading mechanisms in the development of apple fruit. *Acta Horticulturae* 26: 141-146

- Lücker, J., Bowen, P., Bohlmann, J. 2004. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases. *Phytochemistry* 65: 2649-2659
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., Grill, E. 2009. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064
- MacMillan, J. y Beale, M. H. 1999. Diterpene biosynthesis. Pp. 217-243 en Cane, D.E. (ed.) *Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. Elsevier, Amsterdam
- MacMillan, J. y Takahashi, N. 1968. Proposed procedure for the allocation of trivial names to the gibberellins. *Nature* 217: 170-171
- Magome, H., Nomura, T., Hanada, A., Takeda-Kamiya, N., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. 2010. Identification of gibberellin 13-hydroxylases in rice. 20th International Conference on Plant growth Substances, Tarragona, Spain, 28 June-2 July 2010, Abstract PS01-10
- Manning, K., Davies, C., Bowen, H., White, P. 2001. Functional characterization of two ripening-related sucrose transporters from grape berries. *Annals of Botany* 87: 125-129
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A., Marion-Poll, A. 1996. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana glauca*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal* 15: 2331-2342
- Martin, C., Zhang, Y., Tonelli, C., Petroni, K. 2013. Plants, diet, and health. *Annual Review of Plant Biology* 64: 19-46
- Martin, D., Aubourg, S., Schouwey, M., Daviet, L., Schalk, M., Toub, O., Lund, S.T., Bohlmann, J. 2010. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *BMC Plant Biology* 10: 226-231
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K., Kakimoto, T. 2008. Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 105: 20027-20031
- McGarvey, D.J. y Croteau, R. 1995. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell* 7: 1015-1026
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., Steber, C.M. 2003. The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *The Plant Cell* 15: 1120-1130
- McKenzie, R.R. y Deyholos, M.K. 2011. Effects of plant growth regulator treatments on stem vascular tissue development in linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Industrial Crops and Products* 34: 1119-1127

- Medici, A., Laloi, M., Atanassova, R. 2014. Profiling of sugar transporter genes in grapevine coping with water deficit. *FEBS Letters* 588: 3889-3897
- Meimoun, P., Vidal, G., Bohrer, A.-S., Lehner, A., Tran, D., Briand, J., Bouteau, F., Rona, J.-P. 2009. Intracellular Ca^{2+} stores could participate to abscisic acid-induced depolarization and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 4: 830-5
- Merlot, S., Mustilli, A.C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B., Vavasseur, A., Giraudat, J. 2002. Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *The Plant Journal* 30: 601-609
- Meynhardt, J.T. 1963. Assimilation of ^{14}C -labeled carbon dioxide by Barlinka grape berries. *Proceedings of the National Conference on Nuclear Energy, Applications of Isotopes and Radiation*, Pretoria, Republic of South Africa, pp 456-463
- Meynhardt, J.T. 1965. Biosynthesis of dicarboxylic acids through carbon dioxide fixation by an enzyme extract of Barlinka grape berries. *South African Journal of Agricultural Science* 8: 381-392
- Miao, Y., Lv, D., Wang, P., Wang, X.C., Chen, J., Miao, C., Song, C.P. 2006. An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell* 18: 2749-2766
- Milborrow, B.V., Carrington, N.J., Vaughan, G.T. 1988. The cyclization of 8'-hydroxy abscisic acid to phaseic acid in vivo. *Phytochemistry* 27: 757-59
- Milioni, D., Sado, P.E., Stacey, N.J., Domingo, C., Roberts, K., McCann, M.C. 2001. Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the *Zinnia* mesophyll cell system. *Plant Molecular Biology* 47: 221-238
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Annals of Chemistry* 31: 426-428
- Mishra, G., Zhang, W., Deng, F., Zhao, J., Wang, X. 2006. A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* 312: 264-266
- Moing, A., Carbonne, F., Zipperlin, B., Svanella, L., Gaudillère, J.P. 1997. Phloem loading in peach: symplastic or apoplastic? *Physiologia Plantarum* 101: 489-496
- Moreno, D., Berli, F., Piccoli, P., Bottini, R. 2011. Gibberellins and abscisic acid promote carbon allocation in roots and berries of grapevines. *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 220-228
- Mori, I.C., Murata, Y., Yang, Y., Munemasa, S., Wang, Y.F., Andreoli, S., Tiriack, H., Alonso, J.M., Harper, J.F., Ecker, J.R., Kwak, J.M., Schroeder, J.I. 2006. CDPKs CPK6 and

- CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biology* 4: e327
- Morrone, D., Chen, X., Coates, R.M. y Peters, R.J. 2010. Characterization of the kaurene oxidase CYP701A3, a multifunctional cytochrome P450 from gibberellin biosynthesis. *Biochemical Journal* 431: 337-344
- Moyle, R., Schrader, J., Stenberg, A., Olsson, O., Saxena, S., Sandberg, G., Bhalerao, R.P. 2002. Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the Aux/IAA gene family in hybrid aspen. *The Plant Journal* 31: 675-685
- Mullins, M.G., Bouquet, A., Williams, L.E. 1992. *Biology of the Grapevine*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Fenzi, F., Giraudat, J. 2002. *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *The Plant Cell* 14: 3089-3099
- Nagegowda, D.A. 2010. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Letters* 584: 2965-2973
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M., Yamaguchi, I. 2006. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *The Plant Journal* 46: 880-889
- Nakamura, M., Hori, Y. 1985. Postharvest berry drop of seedless berries produced by GA treatment in grape cultivar ‘‘Kyoho’’ II. Relationship between rachis hardness and differentiation of rachis xylem. *Tohoku Journal of Agricultural Research* 33: 101-110
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56: 165-185
- Negri, A.S., Prinsi, B., Rossoni, M., Failla, O., Scienza, A., Cocucci, M., Espen, L. 2008. Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening. *BMC Genomics* 9: 378
- Negrul, A.M. 1938. Evolution of cultivated forms of grapes. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR* 18: 585-588
- Nicou e, E.  ., Savard, S., Belkacemi, K. 2007. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5626-5635
- Nieminen, K., Immanen, J., Laxell, M., Kauppinen, L., Tarkowski, P., Dolezal, K., Tahtiharju, S., Elo, A., Decourteix, M., Ljung, K., Bhalerao, R., Keinonen, K., Albert, V.A.,

- Helariutta, Y. 2008. Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 105: 20032-20037
- Niyogi, K.K., Grossman, A.R., Bjorkman, O. 1998. *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *The Plant Cell* 10:1121-34
- Ohkuma, K., Lyon, J.L., Addicott, F.T., Smith, O.E. 1963. Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. *Science* 142: 1592-1593
- Okamoto, M., Min, X., Seo, M., Nakabayashi, K., Kamiya, Y., Nambara, E., Koshiba, T. 2002. Complementation of a tomato ABA-deficient *sitiens* mutant by an *Arabidopsis* aldehyde oxidase gene, *AAO3*. *Plant and Cell Physiology* 43: S42
- Opaskornkul, C., Lindberg, S., Tiliberg, J. 1999. Effect of ABA on the distribution of sucrose and protons across the plasmalemma of pea mesophyll protoplasts suggesting a sucrose/proton symport. *Journal of Plant Physiology* 154: 447-453
- Pan, Q.H., Li, M.J., Peng, C.C., Zhang, N., Zou, X., Zou, K.Q., Wang, X.L., Yu, X.C., Wang, X.F., Zhang, D.P. 2005. Abscisic acid activates acid invertases in developing grape berry. *Physiologia Plantarum* 125:157-170
- Pandey, S., Nelson, D.C., Assmann, S.M. 2009. Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell* 136: 136-148
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., Alfred, S.E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N.J., Desveaux, D., Rodriguez, P.L., McCourt, P., Zhu, J.K., Schroeder, J.I., Volkman, B.F., Cutler, S.R. 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068-1071
- Pastenes, C., Villalobos, L., Ríos, N., Reyes, F., Turgeon, R., Franck, N. 2014. Carbon partitioning to berries in water stressed grapevines: The role of active transport in leaves and fruits. *Environmental and Experimental Botany* 107: 154-166
- Pei, Z.-M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schroeder, J.I. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731-734
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., Harberd, N.P. 1997. The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes and Development* 11: 3194-3205
- Peppi, M.C., Fidelibus, M.W., Dokoozlian, N. 2006. Abscisic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation, and color of 'Flame Seedless' grapes. *Horticultural Science* 41: 1440-1445

- Peppi, M.C., Fidelibus, M.W., Dokoozlian, N.K. 2007. Application timing and concentration of abscisic acid affect the quality of 'Redglobe' grapes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 82: 304-310
- Pfaffl, M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: E45-E45
- Pillet, J., Egert, A., Pieri, P., Lecourieux, F., Kappel, C., Charon, J., Lecourieux, D. 2012. VvGOLS1 and VvHsfA2 are involved in the heat stress responses in grapevine berries. *Plant and Cell Physiology* 53: 1776-1792
- Pires, E.J.P. y Botelho, R.V. 2002. Emprego de Reguladores de crescimento em viticulture. Pp. 59-81 en *Viticultura e Enologia: atualizando conceitos*. Belo Horizonte: EPAMIG-FECD
- Pires, E.J.P., Fahl, J.I., Carelli, M.L.C., Terra, M.M., Passos, I.R.S., Cruz, L.S.P., Martins, F.P. 1986. Respostas á aplicação de ácido giberélico (GA) em panículas de videira do cultivar IAC-871-13 A Dona. En: *Congresso Brasileiro De Fruticultura*, Brasília. Brasília: EMBRAPA-DDT/CNPq, v. 3, pp 473-477
- Pontin, M.A., Piccoli, P.N., Francisco, R., Bottini, R., Martinez-Zapater, J.M., Lijavetzky, D. 2010. Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaves induced by Ultraviolet-B radiation. *BMC Plant Biology* 10: 224
- Popko, J., Hänsch, R., Mendel, R.R., Polle, A., Teichmann, T. 2010. The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant Biology* 12: 242-258
- Possner, D., Ruffner, H.P., Rast, D.M. 1981. Isolation and biochemical characterization of grape malic enzyme. *Planta* 151: 549-554
- Possner, D.R.E. y Kliever, W.M. 1985. The localization of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* 24: 229-240
- Pratt, C. 1971. Reproductive anatomy in cultivated grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 22: 92-109
- Priest, D.M., Ambrose, S.J., Vaistij, F.E., Elias, L., Higgins, G.S., Ross, A.R.S., Abrams, S.R., Bowles, D.J. 2006. Use of the glucosyltransferase UGT71B6 to disturb abscisic acid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 46: 492-502
- Qin, X., Zeevaart, J.A.D. 1999. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 15354-15361
- Quiroga, A., Berli, F., Moreno, D., Cavagnaro, J., Bottini, R. 2009. Abscisic acid sprays significantly increase yield per plant in vineyard-grown wine grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon through increased berry set with no negative effects on

- anthocyanin content and total polyphenol index of both juice and wine. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 28-35
- Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., Hardtke, C.S. 2011. Mobile gibberellin directly stimulates Arabidopsis hypocotyl xylem expansion. *The Plant Cell* 23: 1322-1336
- Rancic, D., Pekic Quarrie, S., Dodd, I. 2007. Transport of growth regulators to developing xylem tissues: plant ABA status impacts on hydraulic conductance by modifying xylem vessel development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 146: 235-242
- Rapp, A. y G. Versini. 1996. Influence of nitrogen on compounds in grapes on aroma compounds in wines. *Die wein-wissenschaft* 51: 193-203
- Razeto, B. y Espinoza, J. 1990. Efecto del ácido giberélico y su forma de aplicación sobre las yemas o frutos de vides cv. Sultanina. *Investigación Agrícola, Santiago* 10: 13-20
- Reid, K., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S. 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 6: 27-37
- Retamales, J., Bangerth, F., Cooper, T., Callejas, R., Nito, N., Looney, N.E., Nevins, D.J., Halevey, A.H. 1995. Effects of CPPU and GA₃ on fruit quality of Sultanina table grape. *Acta Horticulturae, Wageningen* 26(394): 149-157
- Ribéreau-Gayon, G. 1968. Etude des mecanismes de synthese et de transformation de l'acide tartrique, de l'acide malique, et de l'acide citrique chez *Vitis vinifera* L. *Phytochemistry* 7: 1471-1482
- Ribéreau-Gayon, P. 1959. Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre *Vitis*. University of Bordeaux. Librairie generale de l'enseignement, Paris
- Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., Frommer, W.B. 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *The EMBO Journal* 11: 4705-4713
- Rock, C.D., Heath, T.G., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.D. 1991. Abscisic alcohol is an intermediate in abscisic acid biosynthesis in a shunt pathway from abscisic aldehyde. *Plant Physiology* 97: 670-676
- Roitsch, T., Bittner, M., Godt, D.E. 1995. Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology* 108: 285-294
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C., Bevan, M.W. 2001. Impaired Suc-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signaling. *Plant Journal* 26: 421-433

- Ruffner, H.P., Possner, D., Brem, S., Rast, D.M. 1984. The physiological role of malic enzyme in grape ripening. *Planta* 160: 444-448
- Sagi, M., Scazzocchio, C., Fluhr, R. 2002. The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the *flacca* phenotype in tomato plants. *The Plant Journal* 31: 305-317
- Saito, K., Kasai, Z. 1982. Conversion of L-ascorbic acid to L-idonic acid, L- idono γ -lactone and 2-keto-L-idonic acid in slices of immature grapes. *Plant and Cell Physiology* 23: 499-507
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., Mizutani, M. 2004. *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology* 134: 1439-1449
- Salomon, M.V., Bottini, R., de Souza Filho, G.A., Cohen, A.C., Moreno, D., Gil, M., Piccoli, P. 2014. Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiologia Plantarum* 151: 359-74
- Samson, F., Brunaud, V., Duchêne, S., De Oliveira, Y., Caboche, M., Lecharny ,A., Aubourg, S. 2004. FLAGdb++: a database for the functional analysis of the Arabidopsis genome. *Nucleic Acids Research* 32: D347-D350
- Sánchez-Díaz, M., Irigoyen, J.J., Gómez-Casanovas, N., Pardo, A., Azcón-Bieto, J. El cambio climático global: Efecto previsible del CO₂ sobre los vegetales. Pp. 1111-40 en Reigosa, M., Pedrol, N., Sánchez-Moreiras, A. (eds.). *La Ecofisiología Vegetal: Una Ciencia de Síntesis*. Universidad de Vigo, Vigo Spain
- Sansberro, P., Mroginski, L., Bottini, R. 2004. Abscisic acid promotes growth of *Ilex paraguariensis* plants by alleviating diurnal water stress. *Plant Growth Regulation* 42: 105-111
- Sansberro, P.A. 2000. Estudios fisiológicos acerca del control de brotación en yerba mate (*Ilex paraguayensis* St. Hil.). Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Río Cuarto, pp. 1-120.
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.Y., Márquez, J.A., Cutler, S.R., Rodriguez, P.L. 2009. Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PLY5 through inhibition of clade A PP2Cs. *The Plant Journal* 60: 575-588
- Sarry, J.E., Sommerer, N., Sauvage, F.X., Bergoin, A., Rossignol, M., Albagnac, G., Romieu, C. 2004. Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp. *Proteomics* 4: 201-215

- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M., Matsuoka, M. 2003. Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299:1896-1898
- Sauer N., Caspari T., Klebl F., Tanner W. 1990. Functional expression of the *Chlorella* hexose transporter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceeding of the National Academy of Science, USA* 87: 7949-7952
- Sauer, N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* 581: 2309-2317
- Sauer, N., Ludwig, A., Knoblauch, A., Rothe, P., Gahrtz, M., Klebl, F. 2004. *AtSUC8* and *AtSUC9* encode functional sucrose transporters, but the closely related *AtSUC6* and *AtSUC7* genes encode aberrant proteins in different *Arabidopsis* ecotypes. *The Plant Journal* 40: 120-130
- Sauter, A., Dietz, K.J., Hartung, W. 2002. A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to-shoot signalling. *Plant Cell and Environment* 25: 223-228
- Sawada, S., Kuninaka, M., Watanabe, K., Sato, A., Kawamura, H., Komine, K., Sakamoto, T., Kasai, M. 2001. The mechanism to suppress photosynthesis through end-product inhibition in single-rooted soybean leaves during acclimation to CO₂ enrichment. *Plant and Cell Physiology* 42: 1093-1102
- Schneider, G. y Schliemann, W. 1994. Gibberellin conjugates: an overview. *Plant Growth Regulation* 15: 247-260
- Schneider, G., Jensen, E., Spray, C.R., Phinney, B.O. 1992. Hydrolysis and reconjugation of gibberellin A20 glucosyl ester by seedlings of *Zea mays* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89: 8045-8048
- Schomburg, F.M., Bizzell, C.M., Lee, D.J., Zeevaart, J.A.D., Amasino, R.M. 2003. Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *The Plant Cell* 15: 151-163
- Schwartz, S.H. y Zeevaart, J.A.D. 2009. Abscisic Acid Biosynthesis and Metabolism. Pp. 137-155 en Davies, P.J. (ed.) *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academics Publishers, Dordrecht.
- Schwartz, S.H., Qin, X., Zeevaart, J.A.D. 2003. Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology* 131: 1591-1601
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.D., McCarty, D.R. 1997. Specific oxidative cleavage of carotenoid by VP14 of maize. *Science* 276: 1872-1874

- Schweighofer, A., Hirt, H., Meskiene, I. 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science* 9: 236-40
- Seo, M. y Koshiba, T. 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7: 41-48
- Seo, M. y Koshiba, T. 2011. Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *Journal of Plant Research* 124: 501-507
- Seo, M., Peeters, A.J.M., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A.D., Koornneef, M., Kamiya, Y., Koshiba, T. 2000. The *Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3)* gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97:12908-12913
- Sherson, S.M., Alford, H.L., Forbes, S.M., Wallace, G., Smith, S.M. 2003. Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 54: 525-531
- Sieburth, L.E., Deyholos, M.K. 2006. Vascular development: the long and winding road. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 48-54
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., Sun, T. 1998. The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *The Plant Cell* 10: 155-169
- Silverstone, A.L., Jung, H.S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., Sun, T.P. 2001. Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 1555-1566
- Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H.C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., Valot, B., Zivy, M., Leung, J., Merlot, S., June, M.k. 2009. Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Letters* 83: 2982-2986
- Slewinski, T.L., Zhang, C., Turgeon, R. 2013. Structural and functional heterogeneity in phloem loading and transport. *Frontiers in Plant Science* 4: 244
- Sondergaard, T.E., Schulz, A., Palmgren, M.G. 2004. Energization of transport process in plants. Roles of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology* 136: 2475-2482
- Sorce, C., Giovannelli, A., Sebastiani, L., Anfodillo, T. 2013. Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. *Plant Cell Reports* 32: 885-98
- Spray, C.R., Kobayashi, M., Suzuki, Y., Phinney, B.O., Gaskin, P., MacMillan, J. 1996. The *dwarf-1 (dl)* mutant of *Zea mays* blocks 3 steps in the gibberellin-biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93: 10515-10518

- Stajner, N., Jakse, J., Javornik, B., Masuelli, R.W., Martínez, L.E. 2009. Highly variable AFLP and S-SAP markers for the identification of 'Malbec' and 'Syrah' clones. *Vitis* 48: 145-150
- Staxen, I., Pical, C., Montgomery, L.T., Gray, J.E., Hetherington, A.M., McAinsh, M.R. 1999. Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 1779-1784
- Steele, C.L., Crock, J., Bohlmann, J., Croteau, R. 1998. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*): comparison of constitutive and wound inducible activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of δ -selinene synthase and γ -humulene synthase. *Journal of Biological Chemistry* 273: 2078-2089
- Stines, A.P., Naylor, D.J., Høj, P.B., van Heeswijck, R. 1999. Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. *Plant Physiology* 120: 923-931
- Stoll, M., Loveys, B., Dry, P. 2000. Hormonal changes induced by partial root-zone drying of irrigated grapevine. *Journal of Experimental Botany* 51: 1627-1634
- Su, C.T. y Singletto, V.L. 1969. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry* 8: 1553-1558
- Subrahmanyam, D. y Rathore, V.S. 1992. Plant growth regulators influence $^{14}\text{CO}_2$ assimilation and translocation of assimilates in Indian mustard. *Journal of Agronomy and Crop Science* 168: 145-152
- Swanson, C.A. y El-Shishiny E.D.H. 1958. Translocation of sugars in the Concord grape. *Plant Physiology* 33: 33-37
- Taiz, L. y Zeiger, E. 1998. En Sinauer, A.D. (ed.) *Plant Physiology*, 2nd Edn. Sinauer Associates Inc Publisher, Sunderland
- Takemiya, A., Shimazaki, K. 2010. Phosphatidic acid inhibits blue light-induced stomatal opening via inhibition of protein phosphatase 1. *Plant Physiology* 153: 1555-1562
- Tan, B.C., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D., McCarty, D.R. 1997. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94: 12235-12240
- Terrier, N., Glissant, D., Grimplet, J., Barrieu, F., Abbal, P., Couture, C., Ageorges, A., Atanassova, R., Leon, C., Renaudin, J.P., Dedaldechamp, F., Romieu, C., Delrot, S., Hamdi, S. 2005. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. *Planta* 222: 832-847
- Tholl, D. 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 297-304

- Thomas, S.G., Phillips, A.L., Hedden, P. 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 4698-4703
- Travaglia, C., Balboa, G., Espósito, G., Reinoso, H. 2012. ABA action on the production and redistribution of field-grown maize carbohydrates in semiarid regions. *Journal of Plant Growth Regulation* 67: 27-34
- Travaglia, C., Cohen, A., Reinoso, H., Castillo, C., Bottini, R. 2007. Exogenous abscisic acid increases carbohydrate accumulation and redistribution to the grains in wheat grown under field conditions of soil water restriction. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 285-289
- Travaglia, C., Reinoso, H., Bottini, R. 2009. Application of abscisic acid promotes yield in field-cultured soybean by enhancing production of carbohydrates and their allocation in seed. *Crop Pasture Science* 60: 1131-1136
- Troncoso, C., Carcamo, J., Hedden, P., Tudzynski, B. and Rojas, M.C. 2008. Influence of electron transport proteins on the reactions catalyzed by *Fusarium fjikuroi* gibberellin monooxygenases. *Phytochemistry* 69: 672-683
- Tuominen, H., Puech, L., Fink, S., Sundberg, B. 1997. A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in hybrid aspen. *Plant Physiology* 115: 577-585
- Turgeon, R. y Wolf, S. 2009. Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annual review of plant biology* 60: 207-21
- Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Sun, T.P. 2004. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135: 1008-1019
- Tymowska-Lalanne, Z. y Kreis, M. 1998. Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family. *Planta* 207: 259-265
- Tyree, M.T. 2003. The ascent of water. *Nature* 423: 923
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., Matsuoka, M. 2005. *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693-698
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., Shinozaki, K. 2009. Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 17588-17593

- van Bel, A.J.E. y Gamalei, Y.V. 1992. Ecophysiology of phloem loading in source leaves. *Plant, Cell and Environment* 15: 265-270
- Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., Yu, F., Jikumaru, Y., Ross, J., Cortes, D., Choong, J.M., Joseph, P.N., Lew, M., Vladimir, S., Yuji, K., Steve, R., David, W., Eran,. 2007. Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *The Plant Cell* 19: 32-45
- 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., Gatto, P., Oyzerski, R., Moretto, M., Gutin, N., Stefanini, M., Chen, Y., Segala, C., Davenport, C., Dematte, L., Mraz, A., Battilana, J., Stormo, K., Costa, F., Tao, Q., Si-Ammour, A., Harkins, T., Lackey, A., Perbost, C., Taillon, B., Stella, A., Solovyev, V., Fawcett, J.A., Sterck, L., Vandepoele, K., Grando, S.M., Toppo, S., Moser, C., Lanchbury, J., Bogden, R., Skolnick, M., Sgaramella, V., Bhatnagar, S.K., Fontana, P., Gutin, A., Van de Peer, Y., Salamini, F., Viola, R. 2007. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* 2: e1326
- Vignault, C., Vachaud, M., Çakir, B., Glissant, D., Dédaldechamp, F., Büttner, M., Atanassova, R., Fleurat-Lessard, P., Lemoine, R., Delrot, S. 2005. *VvHT1* encodes a monosaccharide transporter expressed in the conducting complex of the grape berry phloem. *Journal of Experimental Botany* 56: 1409-1418
- Wan, Y., Schwaninger, H., Li, D., Simon, C.J., Wang, Y., Zhang, C. 2008 b. A review of taxonomic research on Chinese wild grapes. *Vitis* 47: 81-88
- Wan, Y., Wang, Y., Li, D., He, P. 2008 c. Evaluation of agronomic traits in Chinese wild grapes and screening superior accessions for use in a breeding program. *Vitis* 47: 153-158
- Wardlaw, I. 1990. The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist* 116: 341-381
- Waters, D.L.E., Holton, T.A., Ablett, E.M., Lee, L.S., Henry, R.J. 2005. cDNA microarray analysis of the developing grape (*Vitis vinifera* cv. Shiraz) berry skin. *Functional and Integrative Genomics* 5: 40-58
- Wayne, H.L. y John, D.E. 1996. Sugar alcohol metabolism in sinks and sources. Pp. 185-207 en Zamski, E., Schaffer, A.A. (eds.) *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-sink Relationships*. Marcel Dekker Inc., New York
- Wen, C.K. y Chang, C. 2002. *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *The Plant Cell* 14: 87-100
- Wheeler, S., Loveys, B., Ford, C., Davies, C. 2009. The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of

- Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. Australian Journal of Grape and Wine Research 15: 195-204
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P., Boles, E. 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters 464: 123-128
- Wild, M., Davière, J.M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P., Achard, P. 2012. The Arabidopsis DELLA RGA- LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. The Plant Cell 24: 3307-3319
- Wilkinson, S. 1999. pH as a stress signal. Plant Growth Regulation 29: 87-99
- Wilkinson, S. y Davies, W.J. 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. Plant Cell and Environment 25: 195-210
- Williams, L.E., Lemoine, R., Sauer, N. 2000. Sugar transporters in higher plants- a diversity of roles and complex regulation. Trends in Plant Science 5: 283-290
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M., Maier, A., Schwechheimer, C. 2007. The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. The Plant Cell 19: 1209-1220
- Wise, M.L., Savage, T.J., Katahira, E., Croteau, R. 1998. Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*). Journal of Biological Chemistry 273: 14891-14899
- Woodger, F., Jacobsen, J.V., Gubler, F. 2004. Gibberellin action in germinating cereal grains. Pp. 221-240 en Davies, P.J. (ed.) Plant hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Wormit, A., Trentmann, O., Feifer, I., Lohr, C., Tjaden, J., Meyer, S., Schmidt, U., Martinoia, E., Neuhaus, H.E. 2006. Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. The Plant Cell 18: 3476- 3490
- Xing, S., Qin, G., Shi, Y., Ma, Z., Chen, Z., Gu, H., Qu, L.-J. 2007. *GAMT2* encodes a methyltransferase of gibberellic acid that is involved in seed maturation and germination in *Arabidopsis*. Journal of Integrative Plant Biology 49: 368-381
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., Zhu, J.K. 2001. The Arabidopsis LOS5/ ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold and osmotic stress-responsive gene expression. The Plant Cell 13: 2063-2083
- Xiong, L.M., Lee, H., Ishitani, M., Zhu, J.K. 2002. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. Journal of Biological Chemistry 277: 8588-8596

- Xu, Y., Simon, J.E., Welch, C., Wightman, J.D., Ferruzzi, M.G., Ho, L., Passinetti, G.M., Wu, Q. 2011. Survey of polyphenol constituents in grapes and grape-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 10586-10593
- Xu, Z.J., Nakajima, M., Suzuki, Y., Yamaguchi, I. 2002. Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiology* 129: 1285-95
- Xu, Z.-Y., Kim, D.H., Hwang, I. 2013. ABA homeostasis and signaling involving multiple subcellular compartments and multiple receptors. *Plant Cell Reports* 32: 807-813
- Yamaki, S. y Asakura, T. 1991. Stimulation of the uptake of sorbitol into vacuoles from apple fruit flesh by abscisic acid add and into protoplasts by indolacetic acid. *Plant and Cell Physiology* 32: 315-318
- Yang, D.L., Yao, J., Mei, C.S., Tong, X.H., Zeng, L.J., Li, Q., Xiao, L.T., Sun, T.P., Li, J., Deng, X. W., Lee, C.M., Thomashow, M.F., Yang, Y., He, Z., He, S.Y. 2012. Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109: E1192-E1200
- Yang, J. y Zhang, J. 2006. Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist* 169: 223-236
- Yu, S., Galvao, V.C., Zhang, Y.C., Horrer, D., Zhang, T.Q., Hao, Y.H., Feng, Y.Q., Wang, S., Markus, S., Wang, J.W. 2012. Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. *The Plant Cell* 24: 3320-3332
- Zapata, C., Deleens, E., Chaillou, S., Magne, C. 2004. Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Plant Physiology* 161: 1031-40
- Zeevaart J.A.D. y Creelman R.A. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 439-73
- Zeevaart, J.A.D. y Creelman, R.A. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 439-473
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Tan, M., Hu, X. 2009. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 421-426
- Zhang, X., Wang, X., Wang, X., Xia, G.H., Pan, Q.H., Fan, R.C., Wu, F., Yu, X., Zhang, D. 2006. A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is

- involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiology* 142: 220-232
- Zhang, Y.L., Meng, Q.Y., Zhu, H.L., Guo, Y., Gao, H.Y., Luo, Y.B., Lu, J. 2008. Functional characterization of a LAHC sucrose transporter isolated from grape berries in yeast. *Plant Growth Regulation* 54: 71-79
- Zhang, Z.L., Ogawa, M., Fleet, C.M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J.O., Lim, J., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., Sun, T.P. 2011. Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 108: 2160-2165
- Zhou, R., Cutler, A.J., Ambrose, S.J., Galka, M.M., Nelson, K.M., Squires, T.M., Loewen, M.K., Jadhav, A. S., Ross, A.R.S., Taylor, D.C., Abrams, S.R. 2004. A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiology* 134: 361-369
- Zhu, S.Y., Yu, X.C., Wang, X.J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.C., Shang, Y., Du, S.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Xu, Y.H., Zhang, X.Y., Zhang, D.P. 2007. Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 3019-3036
- Zhu, Y.Y, Nomura, T., Xu, Y.H., Zhang, Y.Y., Peng, Y., Mao, B.Z., Hanada, A., Zhou, H.C., Wang, R.X., Li, P.J., Zhu, X.D., Mander, L.N., Kamiya, Y.J., Yamaguchi, S., He, Z.H. 2006. ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *The Plant Cell* 18: 442-456
- Zimmermann, M.H. y Ziegler, H. 1975. List of sugars and sugar alcohols in sieve-tube exudates. Pp. 479-503 en Zimmermann, M.H., Milburn, J.A. (eds.) *Encyclopedia of plant physiology*, vol. 1: transport in plants. Springer, Berlin