



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

Tesis para la obtención del título de Magíster en Biotecnología

**Enfoque integrador de análisis transcriptómicos y metabolómicos  
en *Vitis vinifera* cv Tannat para la exploración de la biosíntesis de  
norisoprenoides y sus precursores**

Lic. en Biotecnología Nicolás Nieto Cuello

Tutoras:

PhD. Cecilia Da Silva

PhD. Laura Fariña

Tribunal:

PhD. Inés Ponce de León

PhD Mercedes Fourment

PhD Cristina Olivaro

Mayo del 2025, Montevideo, Uruguay.

# Agradecimientos

A la ANII y a CAP, por el respaldo brindado para llevar adelante este proyecto.

A INIA las Brujas, Laboratorio de Biología Molecular del IIBCE, Área de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones, Laboratorio de Biotecnología de Aromas y al Centro Universitario Regional Noroeste.

A mis tutoras, Cecilia Da Silva y Laura Fariña, por su orientación, su buena disposición, su apertura para compartir conocimiento y su calidad humana durante todo este proceso. Su guía fue fundamental tanto a nivel académico como personal.

A Camilo Álvarez, Luciano Faroppa, Juan Pablo Perdomo, Luis Rodríguez y Marcelo González, por su ayuda en la recolección de muestras, sin la cual este trabajo no habría sido posible.

A Ginebra, por cada noche que pasó a mi lado mientras trabajaba hasta tarde.

A Manuel Filgueira y Gabriela Garmendia, por su motivación y por estar presentes con las palabras justas en los momentos clave.

A Bárbara Martínez, por su apoyo constante.

A mis viejos, por motivarme a seguir formándome.

A Vane, por bancarme siempre. Por la paciencia, por acompañarme en cada momento, incluso en los más difíciles.

Dedico este trabajo a Mauro, Martina y Cloe, con la esperanza de que siempre recuerden que rendirse no es una opción, y que la perseverancia te lleva a cumplir tus objetivos.

# Resumen

El Tannat (*Vitis vinifera* cv. Tannat) es hoy la variedad vinífera más cultivada y emblemática del país. La colección de clones de Tannat en Uruguay se encuentra en la estación experimental INIA “Las Brujas” e incluye parcelas de los clones franceses: 398, 399, 472, 474, 475, 717, 794 y 944.

Tannat se caracteriza por vinos de intenso color, elevada acidez y alta concentración de polifenoles, especialmente taninos, que aportan estructura, astringencia y gran capacidad antioxidante. Su perfil aromático no presenta notas varietales marcadas; en su juventud dominan los aromas frutados, que con la crianza evolucionan hacia matices más complejos. El potencial aromático del Tannat está relacionado con precursores presentes en la uva, como compuestos glicosilados y carotenoides. Estos últimos, sintetizados principalmente en la piel de la baya, dan lugar a norisoprenoides de 13 carbonos que, en su mayoría glicosilados, pueden liberarse durante la crianza por acción enzimática o del medio ácido, contribuyendo así al desarrollo aromático en vinos de guarda.

En esta tesis se seleccionaron los clones 717 y 474 a partir de su contenido de precursores glicosídicos de norisoprenoides (vendimias 2016 a 2018 en madurez), y posteriormente se estudió, durante un período de maduración (diciembre 2019 a marzo 2020), la evolución del perfil de carotenoides (precursores de norisoprenoides) mediante HPLC-DAD, así como la evolución de norisoprenoides en estado glicosilado y libre por GC-MS. Se identificaron 16 carotenoides, 10 norisoprenoides glicosilados y 5 norisoprenoides libres. En ambos clones se observó una caída general en los carotenoides durante la madurez, y un aumento progresivo de los norisoprenoides libres y glicosilados a lo largo del mismo período.

Paralelamente, se identificaron en el genoma de Tannat los genes relacionados con la síntesis de carotenoides (22 genes) y norisoprenoides (7 genes); y se secuenciaron los transcriptomas de las muestras mediante RNA-Seq. Los análisis de expresión diferencial a lo largo de la maduración y comparando clones fueron focalizados en la síntesis de estos compuestos. Relacionados a los carotenoides, 7 genes en el 717 y 5 genes en el 474 mostraron expresión diferencial; mientras que a los norisoprenoides, 2 genes en cada clon mostraron expresión diferencial. Al comparar clones, solo el gen *VIT\_08s0032g00800\_2*, que codifica para una isomerasa de carotenoides (CRTISO), mostró una mayor expresión en el clon 717 en madurez. Por otra parte, no se encontraron genes diferencialmente expresados entre ambos clones en relación con la biosíntesis de norisoprenoides.

Los genes que codifican para CCD4 mostraron correlaciones de Pearson negativas con varios carotenoides y positivas con algunos norisoprenoides en ambos clones.

Este trabajo aportó nuevos conocimientos sobre la síntesis de norisoprenoides en Tannat, identificando genes, metabolitos y relaciones clave entre ellos.

# Tabla de contenido

1. Abreviaturas.....	- 6 -
2. Introducción .....	- 7 -
2.1. <i>Vitis vinifera</i> cv. Tannat.....	- 7 -
2.1.1. Introducción del Tannat al Uruguay y actualidad .....	- 7 -
2.1.2. Desarrollo de la baya .....	- 8 -
2.2. Compuestos aromáticos en Tannat y su biosíntesis .....	- 9 -
2.2.1. Carotenoides: Precursores aromáticos .....	- 10 -
2.2.2 Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas .....	- 12 -
2.2.3. Norisoprenoides.....	- 13 -
2.2.4 El rol de las CCD en biosíntesis de norisoprenoides .....	- 14 -
2.3. Metodologías para el estudio de compuestos aromáticos, sus precursores y biosíntesis .....	- 15 -
2.3.1. Metodologías químicas de caracterización de compuestos aromáticos libres y glicosilados .....	- 15 -
2.3.2. Metodologías químicas de caracterización de carotenoides.....	- 16 -
2.3.3 Técnicas para determinar la expresión de genes que codifican para las enzimas involucradas en estas vías metabólicas .....	- 16 -
3. Hipótesis .....	- 18 -
4. Objetivos.....	- 18 -
4.1. Objetivo general .....	- 18 -
4.2 Objetivos específicos.....	- 18 -
5. Materiales y Métodos .....	- 19 -
5.1. Selección de clones contrastantes en contenido de precursores aromáticos.....	- 19 -
5.2. Identificación de genes asociados a la vía de síntesis de norisoprenoides y sus precursores .....	- 19 -
5.3. Determinación de estadios clave en el desarrollo de la baya para el estudio de la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de norisoprenoides.....	- 20 -
5.4. Muestreo .....	- 21 -
5.5. Análisis fisicoquímico de bayas .....	- 22 -
5.6. Extracción, identificación y cuantificación de carotenoides por HPLC-DAD.....	- 23 -
5.7. Extracción, identificación y cuantificación de norisoprenoides glicosilados y libres por GC-MS .....	- 24 -
5.8. Extracción de ARN total y preparación para secuenciación .....	- 26 -

5.9. Procesamiento de resultados de secuenciación .....	- 27 -
5.10. Integración de resultados transcriptómicos y metabolómicos .....	- 27 -
6. Resultados y Discusión .....	- 28 -
6.1. Selección de clones contrastantes en contenido aromático .....	- 28 -
6.2 Identificación de genes asociados a la vía de síntesis de norisoprenoides y sus precursores .....	- 29 -
6.3 Determinación de estadios clave en el desarrollo de la baya para el estudio de la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de norisoprenoides .....	- 32 -
6.4 Análisis fisicoquímico de las bayas .....	- 33 -
6.5. Extracción, identificación y cuantificación de carotenoides por HPLC-DAD. ....	- 36 -
6.6. Extracción, identificación y cuantificación de norisoprenoides glicosilados por GC-MS- 41 -	
6.7. Extracción de ARN total y preparación para secuenciación .....	- 45 -
6.8. Procesamiento de resultados de secuenciación .....	- 46 -
6.8.1. Análisis global del transcriptoma .....	- 46 -
6.9. Análisis de genes relacionados a la biosíntesis de carotenoides y norisoprenoides- 50 -	
6.9.1. Genes relacionados a la biosíntesis de carotenoides .....	- 50 -
6.9.2. Genes relacionados a la biosíntesis de norisoprenoides .....	- 52 -
6.10. Integración de resultados transcriptómicos y metabolómicos .....	- 54 -
7. Conclusiones .....	- 58 -
8. Bibliografía .....	- 61 -
9. Anexos .....	- 66 -
Anexo 1 .....	- 66 -
Anexo 1.a .....	- 66 -
Anexo 1.b .....	- 67 -
Anexo 2 .....	- 69 -
Anexo 2.a .....	- 69 -
Anexo 2.b .....	- 72 -
Anexo 2.c .....	- 74 -

# 1. Abreviaturas

Abreviatura	Significado
Vv	<i>Vitis vinifera</i>
sdf	Semanas después de floración
CCD	Clivaja de escisión de carotenoides
DEG	Gen diferencialmente expresado
EdD	Estadios de desarrollo
G	5 semanas después de floración
EV	Envero cuando las bayas se encuentran verdes
ER	Envero cuando las bayas se encuentran rojas
M	Madurez enológica
PCA	Análisis de componentes principales
PC	Componente principal
LFC	Log <sub>2</sub> (FoldChange)
RLD	Regularized log
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
GC	Cromatografía gaseosa
MS	Espectrómetro de masa
DAD	Detector de arreglo de diodos

## 2. Introducción

### 2.1. *Vitis vinifera* cv. Tannat

#### 2.1.1. Introducción del Tannat al Uruguay y actualidad

Los primeros viñedos en Uruguay fueron plantados por los españoles que desembarcaron en el siglo XVI (Carrau 1997). No obstante, fue recién en el año 1870 cuando el vascofrancés Pascual Harriague le dio el gran impulso a la variedad Tannat (*Vv* cv. Tannat). Harriague, luego de haber ensayado con distintas uvas, plantó un viñedo de Tannat en la ciudad de Salto en un contexto donde la vitivinicultura uruguaya se proyectaba en términos de cantidad y no calidad, produciendo vinos con mala reputación (De Frutos et al. 1999).

Con la propuesta de dirigir la producción nacional a vinos finos Tannat, en la década del 1990 se introdujeron clones certificados libres de virus seleccionados en Francia. Estos clones comerciales de Tannat introducidos en Uruguay fueron los 398, 399, 472, 474, 475, 717, 794 y 944. El clon 398, a pesar de la falta de ensayos que verifican sus cualidades especiales se consolidó como el más cultivado, representando más del 50% del total de las plantaciones (De Frutos et al. 1999, Disegna et al. 2014).

En la actualidad, el Tannat se considera la variedad de vid vinífera insignia del país, y a su vez, la más cultivada. Siendo en el año 2024, un 26,5% de la superficie de vid plantadas en el país (INAVI, 2024). A pesar de que la variedad Tannat es originaria de la región de Madirán (sur de Francia), actualmente es muy poco cultivada en Europa y hasta hace algunos años Uruguay era el único país americano en producirlo (Boido et al. 2003).

Esta variedad se destaca respecto a otras variedades tintas por ser la que contiene una mayor adaptación agroecológica y su alta concentración de polifenoles, los cuales son los responsables del intenso color, la estructura en boca y el elevado poder antioxidante de sus vinos. Por otra parte, el aroma de los vinos de Tannat es moderado o bajo comparado con los de otras variedades ya que se la considera una variedad neutra. Esta característica es poco deseada principalmente en vinos jóvenes ya que el aroma del vino es un atributo que junto con otros parámetros sensoriales definen la calidad de este (Fariña et al, 2021).

### **2.1.2. Desarrollo de la baya**

La baya de Vv se desarrolla a través de un proceso dinámico y complejo que implica una cascada de cambios bioquímicos.

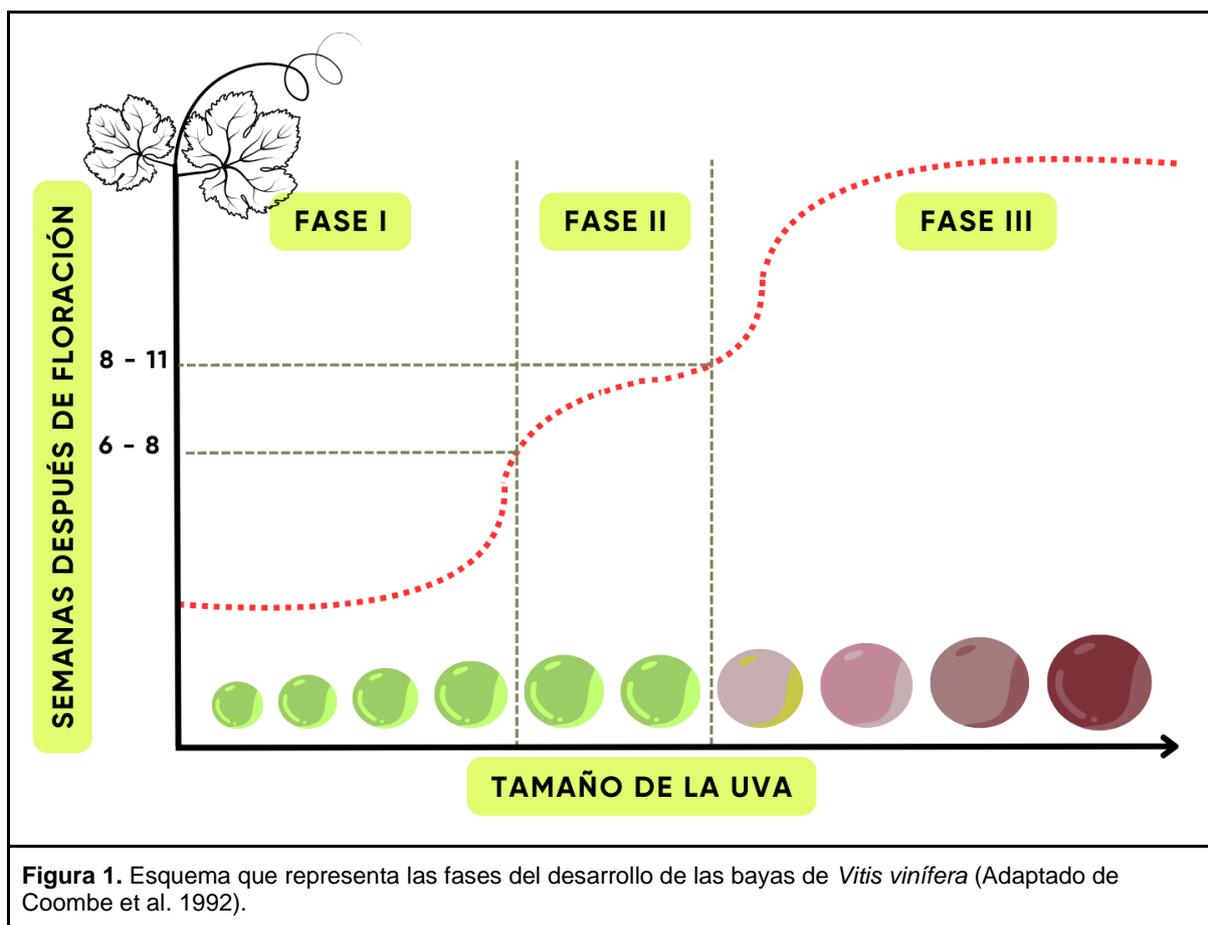
Es un proceso continuo en un patrón de crecimiento doble sigmoide que puede describirse en tres fases de crecimiento tal como se detalla en la Figura 1 (Coombe 1992, Coombe McCarthy 2000, y Malacarne et al. 2024).

En la etapa inicial o Fase I de crecimiento, se produce un rápido crecimiento y rápida división mitótica celular, dando como resultado el desarrollo de los tres tejidos que componen la baya: piel, pulpa y semilla (Vasconcelos et al. 2009). Los ácidos málico y tartárico comienzan a sintetizarse en esta fase y se almacenan en las vacuolas hasta alcanzar su concentración máxima al final de la Fase I. También ocurre la síntesis de carotenoides en la piel de la baya (Razungles et al. 1998, Mendes-Pinto et al. 2005).

En esta fase también ocurre la biosíntesis de los ácidos hidroxicinámicos, precursores de los compuestos fenólicos volátiles.

La Fase II, es conocida por ser una fase lenta, donde el tamaño de las bayas no aumenta debido a que la división celular se detiene (Harris et al. 1968). Las bayas, en este periodo, se caracterizan por ser duras, verdes y con elevados niveles de acidez. El tamaño final de la semilla se alcanza en esta etapa. Al final de la Fase II comienza la acumulación de azúcares en la pulpa. (Coombe, et al. 1992).

La Fase III, conocida a su vez como envero o maduración, es la etapa en la cual comienza la aparición del color de las bayas, debido a la aparición y acumulación de antocianinas en la cáscara de las uvas tintas. Las bayas se ablandan y duplican su tamaño como consecuencia de la expansión celular que ocurre en sus tejidos (Coombe et al. 1992). En esta fase, se continúan acumulando los azúcares en la pulpa a medida que disminuye la concentración de los ácidos orgánicos (Malacarne et al., 2024). Durante esta fase, finaliza la biosíntesis de carotenoides en la piel de la baya y se induce su degradación, formando una gran parte de las moléculas aromáticas, principalmente, norisoprenoides de trece carbonos (Smit et al. 2019, Schwab & Wüst, 2015, Meng et al. 2020, Wang y Luca et al. 2005, Razungles et al. 1998, Mendes-Pinto et al. 2005).



## 2.2. Compuestos aromáticos en Tannat y su biosíntesis

Los compuestos volátiles en el vino presentan diversas estructuras químicas (terpenos, compuestos fenólicos, ésteres etílicos, lactonas, alcoholes, norisoprenoides, entre otros) y orígenes, ya que se pueden generar durante las distintas etapas de proceso de vinificación (varietal, prefermentativo, fermentativo, crianza) (Fariña et al. 2008).

Dentro de los componentes responsables del aroma de un vino, hay una fracción que se denomina “carácter varietal” formada por aquellos compuestos que provienen de la uva (terpenos, norisoprenoides, etc.) (Lashbrooke et al. 2013). Los C<sub>13</sub>-norisoprenoides son parte de esta fracción y se consideran compuestos aromáticos esenciales de las uvas, se caracterizan por sus aromas agradables frutales y florales y por poseer bajos umbrales olfativos (Gómez-plaza et al. 2012). La formación de los C<sub>13</sub>-norisoprenoides presentes en los vinos se da principalmente en la uva a través de la ruptura de carotenoides. Una vez generados los norisoprenoides pueden glicosidarse y acumularse de esta forma en la uva o permanecer en estado libre.

Dentro de este “carácter varietal” del vino hay presente un reservorio de moléculas; los precursores aromáticos (carotenoides, precursores glicosilados, cisteínicos); los cuales no

presentan aroma, provienen de la uva, pero bajo ciertas circunstancias pueden sufrir hidrólisis u otro proceso de rearrreglo molecular liberando una molécula volátil y con impacto aromático (López et al. 2013). En el caso de los compuestos glicosilados (los cuales comprenden terpenos, sesquiterpenos, compuestos fenólicos y norisoprenoides, entre otros), principalmente durante la crianza este reservorio será un suministro de moléculas volátiles sensorialmente activas que irá enriqueciendo y cambiando el perfil del vino con un impacto fundamental en la evolución aromática durante la crianza y su tiempo de vida.

### **2.2.1. Carotenoides: Precursores aromáticos**

Los carotenoides, que engloban tanto a los carotenos (hidrocarbonados) como a las xantofilas (con oxígeno en su estructura), son derivados tetraterpénicos (40 carbonos), solubles en solventes orgánicos y poseen un color anaranjado con una absorción máxima a 530 nm. Se encuentran ubicados en las células vegetales dentro de organelos especializados, como los cloroplastos y cromoplastos, en los primeros acompañan a las clorofilas. Estas moléculas desempeñan una doble función en las plantas: actúan como pigmentos accesorios en la absorción de energía lumínica y como disipadores de energía excedente en forma de calor, previniendo daños significativos.

Aunque su eficiencia como transductores de energía hacia los centros de reacción es relativamente baja (30 % - 40 %), los carotenoides son altamente efectivos en disipar el exceso de energía absorbida por la clorofila.

Entre los carotenos más importantes se encuentra el  $\beta$ -caroteno, mientras que la luteína es la principal xantofila, siendo la suma de ambos el 80-85% de la fracción total. Acompañando a luteína y  $\beta$ -caroteno en mucho menor proporción se encuentra en la uva violaxantina, anteraxantina y zeaxantina, estas últimas desempeñan un papel crucial en la disipación de energía excedente mediante el denominado ciclo de las xantofilas donde la zeaxantina, recibe directamente la energía de la clorofila excitada y la disipa en forma de calor, sin emitir radiación. Este proceso se revierte cuando la luz disminuye, cerrando así el ciclo. La importancia de este ciclo de xantofilas radica en su capacidad para disipar de manera segura el exceso de energía lumínica (Matei et al. 2011).

En las plantas vasculares, la función principal de los carotenoides no reside únicamente en actuar como pigmentos accesorios, sino en la disipación del exceso de energía y en la detoxificación de las formas reactivas de oxígeno generadas durante la fotosíntesis protegiendo de este modo el aparato fotosintético. En presencia de un exceso de luz, el oxígeno se vuelve tóxico, reacciona con la clorofila excitada, formando un singlete de oxígeno, altamente reactivo y puede oxidar las clorofilas (blanqueamiento) y otros compuestos. Los

carotenoides disipan este radical peróxido y la clorofila excitada, adquiriendo un estado triplete que a su vez disipa calor al medio (Demmig-Adams et al. 1992).

Además de las funciones antes mencionadas relacionadas a la captación de la luz y disipación de energía, los carotenoides sirven como provisión de sustratos para la formación de diversos compuestos, como moléculas promotoras del crecimiento como la hormona del ácido abscísico (ABA) y compuestos aromáticos como se muestra en la Figura 2 (Taiz et al. 2003, Rodríguez-Bustamante et al. 2007).

El contenido de carotenoides en las plantas está relacionado a los procesos metabólicos de las células vegetales, que son dependientes de factores climáticos, prácticas agrícolas y las variedades de las plantas (Opazo, 2018).

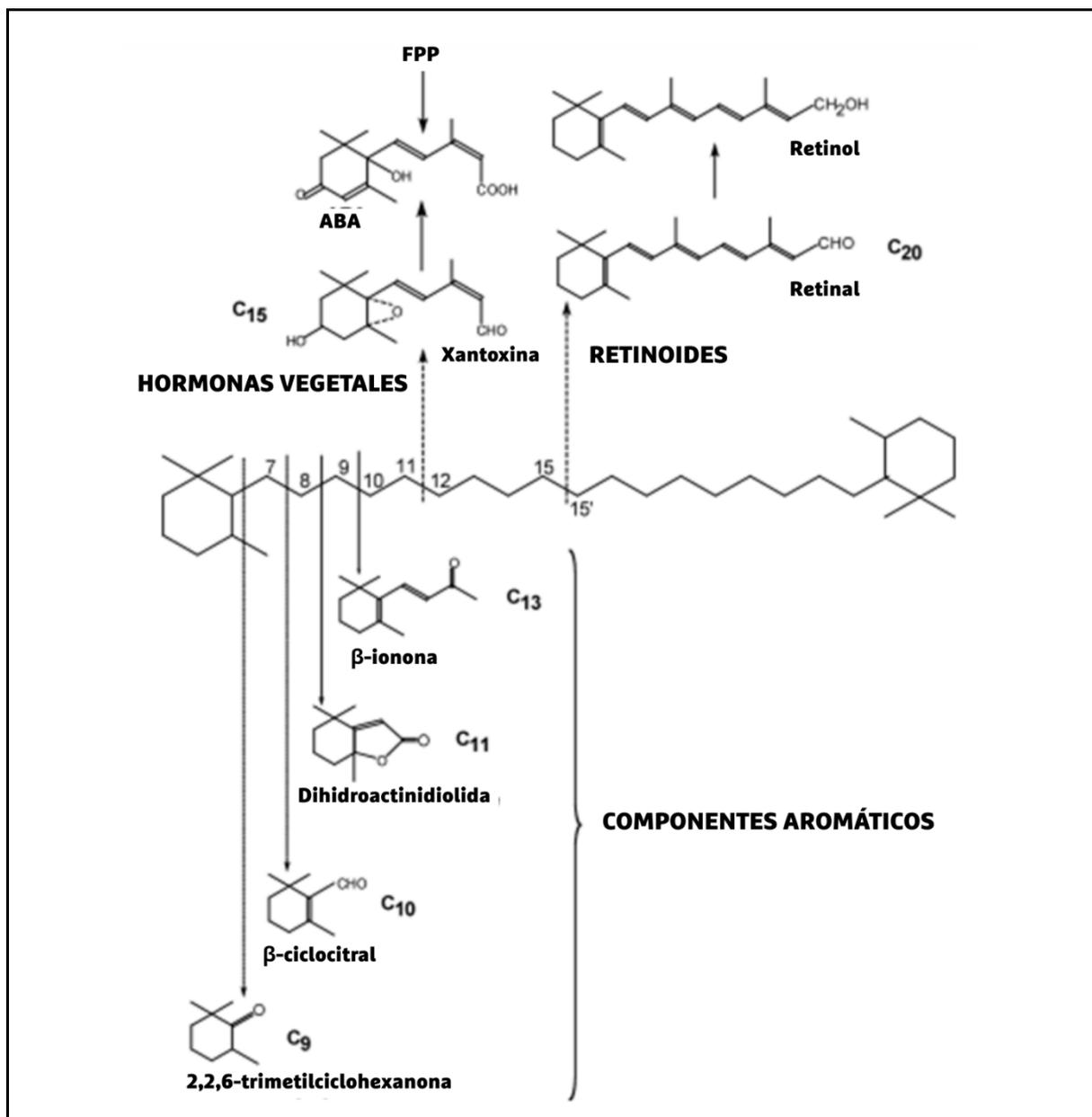


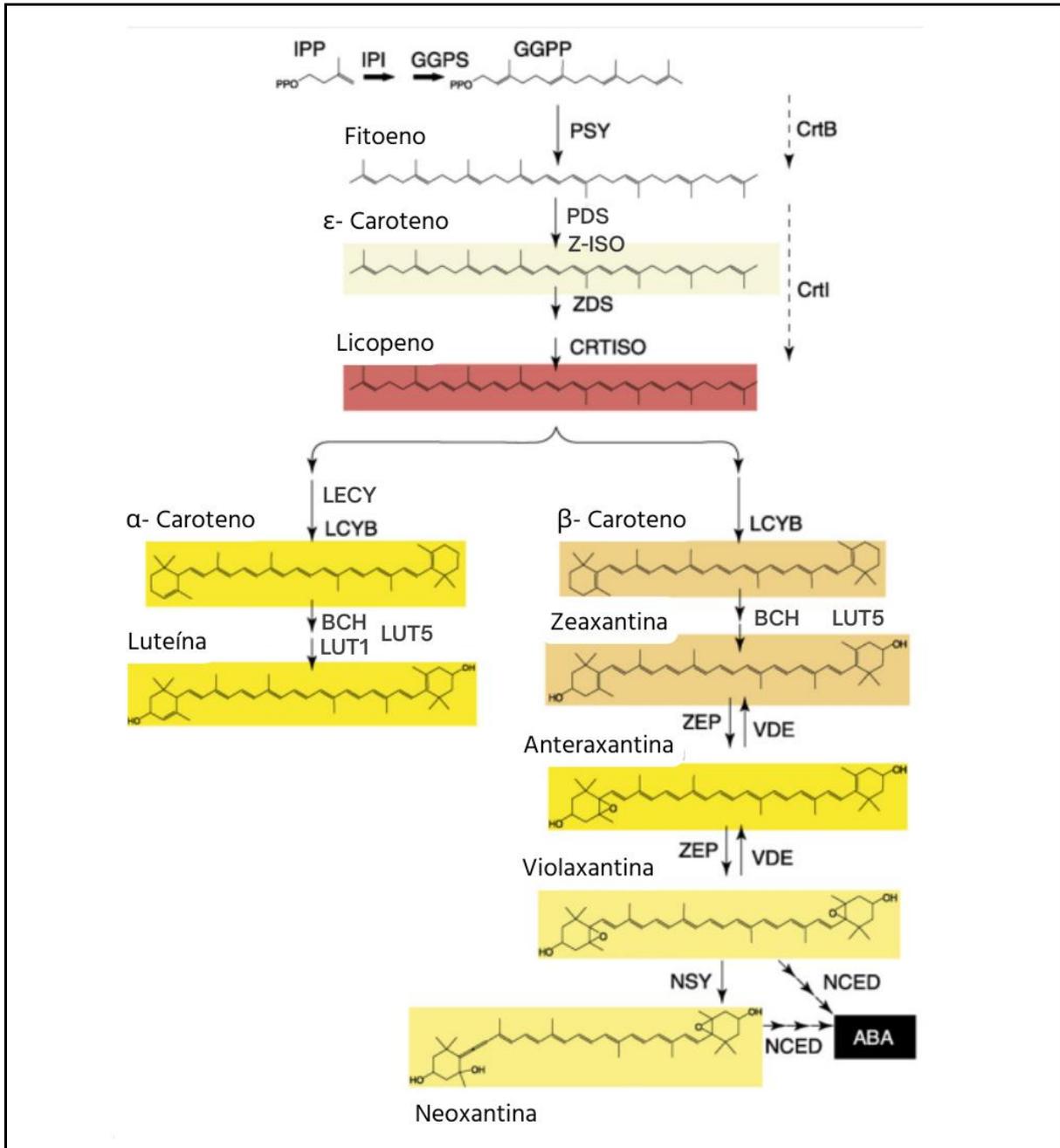
Figura 2. Productos del clivaje de carotenoides. Adaptado de Rodríguez-Bustamante et al. 2007.

### 2.2.2 Ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas

La biosíntesis de los carotenoides (Figura 3) se inicia a partir de la condensación de cuatro unidades de isopreno (IPP) de cinco carbonos cada una, generando geranil geranil-pirofosfato (GGPP) de veinte carbonos. Posteriormente a través de la unión de dos moléculas de GGPP catalizado por la fitoeno sintasa (PSY, EC:2.5.1.32) se forma el primer carotenoide de cuarenta carbonos denominado fitoeno.

Los dobles enlaces conjugados son agregados subsecuentemente por el conjunto de enzimas fitoeno desaturasa (PDS, EC:1.3.5.5) y zeta caroteno isomerasa (Z-ISO, EC:5.2.1.12) y por otra parte ζ-caroteno desaturasa (ZDS, EC:1.3.5.6). Estas reacciones de desaturación forman a los intermediarios fitoflueno, ζ-caroteno, neurosporeno y licopeno, que contienen cinco, siete, nueve y once dobles enlaces conjugados, respectivamente. A partir del incremento del número de dobles enlaces conjugados, se desplaza la absorción hacia longitudes de onda mayores, dando como resultado fitoenos y fluoenos menos coloreados, ζ-caroteno amarillo pálido, neurosporeno anaranjado–amarillento y licopeno rojo. Durante los pasos de desaturación, todas las formas cis-licopeno, productos de ZDS, se transforman en trans-licopeno mediante la acción de la enzima carotenoide isomerasa (CRTISO, EC:5.2.1.13).

La ciclización del licopeno se cataliza por la licopeno β-ciclasa (LCYB, EC:5.5.1.19) y licopeno ε-ciclasa (LECY, EC:5.5.1.18). Se obtienen por un lado α-caroteno y por el otro β-caroteno, los cuales son modificados sufriendo hidroxilación y epoxidación donde se obtiene una gran variedad de estructuras. Los derivados oxigenados del caroteno son conocidos como xantofilas. Las hidroxilaciones de los anillos del α-caroteno son catalizadas por las enzimas β-caroteno hidroxilasa (BCH, EC:1.14.15.24), ε-caroteno hidroxilasa (LUT1, EC:1.14.14.158) y β-caroteno 3-hidroxilasa LUT5 (EC:1.14.-.-). La enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP, EC:1.14.15.21), cataliza la epoxidación de las posiciones C5,6 y C5'6' de anillo β de la zeaxantina que pasa a anteraxantina (con un anillo epoxidado) y posteriormente a violaxantina (con los dos anillos epoxidados). Esta interconversión se conoce como el ciclo de las xantofilas y representa una maquinaria crítica para proteger a las plantas en condiciones de alta intensidad luminosa (Sun et al., 2022). La violaxantina es convertida a neoxantina por la enzima neoxantina sintasa (NSY, EC:5.3.99.9) que hidroliza el epóxido de uno de los anillos β. Tanto la como 9-*cis*-violaxantina y 9-*cis*-neoxantina pueden ser clivadas a xantoxina por 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED, EC:1.13.11.51), y luego convertidas en la hormona Ácido Abscísico (ABA) a través de un intermediario aldehído (Tanaka et al. 2008).



**Figura 3 - Ruta de biosíntesis de carotenoides.** Solo se muestran las configuraciones trans. IPI, isopentenil pirofosfato isomerasa; GGPS, geranylgeranyl difosfato sintasa; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; Z-ISO, Zeta-caroteno isomerasa, ZDS, ζ-caroteno desaturasa; CRTISO, carotenoide isomerasa; LCYB, licopeno β-ciclasa; LECY, licopena ε-ciclasa; BCH, ε-caroteno hidroxilasa; LUT1, β-caroteno 3-hidroxilasa; LUT5, β-anillo hidroxilasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa; VDE, violaxantina de-epoxidasa; NSY, neoxantina sintasa; NCED, 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (Adaptado de Tanaka et al. 2008).

### 2.2.3. Norisoprenoides

La formación de C<sub>13</sub> norisoprenoides resulta del clivaje en la posición del carbono 9-10 de los carotenoides (Rodríguez-Bustamante et al. 2007). Los cuales, al encontrarse de forma libre,

tienen la particularidad de ser aromáticos teniendo umbrales de percepción muy bajos comparados con otros compuestos (Fariña et al. 2010, Fariña et al. 2015).

Particularmente, la ruptura de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno en la posición 9-10 genera como producto final  $\alpha$ - y  $\beta$ -ionona respectivamente. Por otra parte, el producto de degradación de la neoxantina en la misma posición conlleva a la formación de la grasshopper cetona, y mediante una serie de reacciones sucesivas se genera la  $\beta$ -damascenona (Rodríguez-Bustamante et al. 2007). En un estudio publicado por Yuan y colaboradores (2008) donde investigaron la correlación entre la cinética de síntesis y degradación de carotenoides y  $C_{13}$ -norisoprenoides en uvas Pinot noir, muestran que  $\alpha$ -ionona y  $\beta$ -ionona poseen una correlación positiva con los carotenoides excepto con neocromo b y violaxantina. A su vez, el norisoprenoide vitispirano mostró una correlación positiva con neoxantina. Se encontró también que  $\alpha$ -ionona y  $\beta$ -ionona están positivamente correlacionados, siendo igual el caso de 1,1,6-trimetil dihidronaftaleno (TDN) y vitispirano. Esto podría sugerir que  $\alpha$ -ionona comparte la misma vía metabólica que  $\beta$ -ionona al igual que TDN con vitispirano (Yuan et al. 2008).

El clivaje de carotenoides ocurre mediante dos tipos de factores; químicos y enzimáticos. Dentro de las reacciones de degradación química, se encuentran la degradación térmica, fotodegradación y auto oxidación. Mientras que las reacciones enzimáticas comprenden a varias enzimas, como las oxigenasas de escisión de carotenoides (CCO) también conocida como dioxigenasas de escisión de carotenoides (CCD), lipoxigenasas (LOX), xantina oxidasa, fenol oxidasas y peroxidasas. A partir de las reacciones previamente nombradas se obtienen como resultado productos de escisión (Guedes de Pinho et al. 2013). Los mismos pueden pasar a ser parte de una amplia diversidad de metabolitos que a través de reacciones de glicosilación enzimática se almacenan como glicoconjugados. Estos compuestos glicoconjugados pueden liberar su aglicona volátil durante la fermentación a través procesos enzimáticos o procesos de hidrólisis ácida durante la crianza (Sefton et al. 1989, Skouroumounis et al. 1992, Freitas et al.1999, Janusz et al. 2003).

#### **2.2.4 El rol de las CCD en biosíntesis de norisoprenoides**

Las dioxigenasas de escisión de carotenoides (CCD) son una familia de enzimas que catalizan la ruptura oxidativa de carotenoides. En *Arabidopsis* se encuentran nueve miembros en la familia de genes que codifican para las CCD. En esta familia de enzimas se incluyen cinco 9-*cis*-epoxy-dioxygenasas (NCEDs) y cuatro clases de CCD. Las enzimas NCEDs catalizan los primeros pasos de degradación de carotenoides que conllevan a la biosíntesis del ABA, mientras que la familia CCD que incluye las proteínas CCD1, CCD4, CCD7 y CCD8

clivan los carotenoides en posiciones específicas generando una variedad de sustratos. Las CCD7 y CCD8 están involucradas en la formación de hormonas inhibitoras de la ramificación de brotes y estrigolactona mediante un clivaje secuencial de carotenoides. Por otro lado, el clivaje catalizado en los dobles enlaces por CCD1 y CCD4 da como resultado la biosíntesis de componentes volátiles (Lashbrooke et al. 2013; Dockrall, 2012).

Se ha demostrado en *Vv* la actividad catalítica de *Vv*CCD1 para clivar los dobles enlaces de las posiciones 9,10(9',10') de zeaxantina, luteína, licopeno y  $\beta$ -caroteno y obtener como productos  $\beta$ -ionona y  $\beta$ -damascenona (Dockrall, 2012). La expresión del gen *Vv*CCD1 se ve aumentada en envero, encontrándose un periodo de retraso de 1 a 2 semanas entre la expresión del transcripto y el incremento de norisoprenoides  $C_{13}$  glicosilados (Yuan et al. 2016). El gen CCD4 se encuentra en dos isoformas, *Vv*CCD4a y *Vv*CCD4b. Estas enzimas son más sustrato-específicas que *Vv*CCD1 y catalizan principalmente el clivaje de carotenoides cíclicos no polares como por ejemplo  $\beta$ -caroteno (Lashbrooke et al. 2013).

## **2.3. Metodologías para el estudio de compuestos aromáticos, sus precursores y biosíntesis**

### **2.3.1. Metodologías químicas de caracterización de compuestos aromáticos libres y glicosilados**

Los compuestos aromáticos en las bayas de *Vv* pueden encontrarse de forma libre o glicosilados. Una metodología que permite la extracción de estos compuestos es la extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos ENV+ de Isolute (IST Ltd., Mid Glamorgan, Reino Unido). Estos cartuchos se encuentran empaquetados con 1 gramo de un polímero de estireno-divinilbenceno (40-140  $\mu$ m, cod. No. 915-0100-C) donde los compuestos aromáticos libres y glicosilados son retenidos. En una primera instancia los compuestos libres retenidos en el cartucho se eluyen con diclorometano y posteriormente los compuestos glicosilados son eluidos del cartucho con metanol. La fracción glicosidada o ligada posteriormente es sometida a una hidrólisis enzimática con Cytolasa PCL5 (Gist-brocades, Lille Ce`dex, Francia) para obtener la agliconas correspondientes. Previo a la inyección en el GC-MS las agliconas que se obtuvieron de la fracción ligada se secan con sulfato de sodio y se concentran con nitrógeno (Boido et al. 2003).

Para los compuestos aromáticos libres, existen otras metodologías rápidas y libres de solventes como la microextracción en fase sólida (SPME). Esta técnica se basa en la absorción de los compuestos volátiles de la muestra en una fibra compuesta de sílice y

recubierta con un sorbente. Los compuestos retenidos en la fibra luego son eluidos de esta mediante el uso de temperatura o solventes para ser analizados por GC (Perestrelo et al. 2011).

### **2.3.2. Metodologías químicas de caracterización de carotenoides**

El análisis de carotenoides tiene como complejidad la diversidad de estructuras que estas moléculas pueden presentar, con el agregado de que además existen en isoformas *cis* y *trans*. También, su estructura de dobles enlaces conjugados hace delicada su trabajo y manipulación debido a su inestabilidad frente a la luz, calor, oxígeno y ácidos. Estas características hacen necesario el uso de antioxidantes como 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol (BHA) y la protección contra la luz directa (Crupi et al. 2010).

La extracción de carotenoides en bayas de vid es posible mediante extracción líquido-líquido (Fariña et al. 2010) con solventes orgánicos apróticos y de baja polaridad como acetona o dietil éter/hexano 1:1.

A través de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es posible la separación y posterior identificación y cuantificación de estas moléculas. Las columnas C<sub>30</sub> de fase reversa permiten una separación acorde, siendo esta capaz de resolver isómeros estructurales y geométricos, junto con la utilización de detectores de arreglo de diodos (DAD) y MS, para la identificación y cuantificación (Crupi et al. 2010).

### **2.3.3. Técnicas para determinar la expresión de genes que codifican para las enzimas involucradas en estas vías metabólicas**

Posteriormente al dogma central formulado por Francis Crick en 1958 donde determina que la información genética es transcrita de ADN o ARN y luego traducida a proteína, Jacob y Monod en 1961 propusieron el modelo en el cual el gen que codifica a una proteína es transcrito en un intermediario de vida corta asociado al ribosoma. A este intermediario se lo llamó ARN mensajero (ARNm), y desde entonces se fueron descubriendo otros mecanismos clave como el *splicing* de los genes y la capacidad catalítica del ARN en los ribosomas. También se identificaron muchas otras formas de ARN que no codifican proteínas, como el ARN de transferencia (ARNt), los ARN pequeños nucleares (snoRNAs), los ARN guía (gRNAs) y los microARN (miRNA), entre otros. Siendo estos hallazgos, incentivo para el desarrollo de diversas técnicas que permitieran estudiar la arquitectura y regulación de los ARNs (Dong y Chen 2013).

Hoy en día existen varias metodologías para estudiar los genes que se transcriben en un tejido y un momento dado de un organismo. Los análisis de microarrays, basados en la hibridación del ARN, son sensibles y precisos, pero limitados por la hibridación de fondo, el rendimiento de las diferentes sondas, y a los genes que estén caracterizados en las sondas presentes en el chip; lo cual limita el análisis a genes previamente caracterizados. Por otra parte, el PCR cuantitativo en tiempo real con transcripción reversa (RT-qPCR) es una técnica muy utilizada debido a su practicidad, sensibilidad, especificidad, rapidez y capacidad cuantitativa (Harshitha y Arunraj 2021, Wagner 2013, Bong et al. 2024), pero es una técnica costosa y no puede utilizarse para un estudio de la expresión genética de todo el genoma (Mutz et al. 2013).

Actualmente la secuenciación de ARN (RNA-Seq) a través de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) es una metodología rápida, barata y más completa para el estudio del transcriptoma. Esta tecnología se basa en crear una librería de fragmentos de DNA copia (cDNA) a partir de una población de ARN total o fraccionado por sus extremos poly (A). Estos fragmentos son adicionados de adaptadores y secuenciados de manera de obtener lecturas de secuencias cortas de entre 30 y 400 pares de bases. Estas lecturas (*reads*) resultantes son alineadas contra un genoma de referencia o ensambladas *de novo* para producir un mapa transcriptómico del genoma que permite estudiar la estructura transcripcional y/o el nivel de expresión de cada gen (Wang et al. 2009, Li et al. 2006, Mortazavi et al. 2008, Cloonan et al. 2008, Lister et al. 2008, Nagalakshmi et al. 2008, Sultan et al. 2008, Wilhelm et al. 2008).

En el caso del estudio de los genes involucrados en la biosíntesis de componentes aromáticos y sus precursores en la uva Tannat, el abordaje de RNA-seq permite determinar los patrones de expresión de estos genes durante distintas etapas del desarrollo de la baya, y, mediante un análisis de expresión diferencial, es posible identificar las diferencias de expresión entre diferentes clones de esta variedad, permitiendo así diferenciar su potencial aromático. Gracias a la existencia del genoma de Tannat secuenciado (Da Silva et al. 2013), se puede realizar un abordaje conjunto desde las técnicas de RNA-seq, HPLC-DAD y GC-MS para el estudio de la síntesis de precursores aromáticos en las uvas Tannat.

### 3. Hipótesis

Las diferencias en los componentes aromáticos glicosilados y en los patrones de expresión génica entre dos clones comerciales de *Vitis vinifera* cv. Tannat con distinto potencial aromático se deben a variaciones en la expresión de genes asociados a las rutas biosintéticas de estos compuestos.

### 4. Objetivos

#### 4.1. Objetivo general

Explorar los mecanismos moleculares y metabólicos que regulan la síntesis de norisoprenoides en *Vitis vinifera* cv. Tannat mediante un enfoque integrador de análisis transcriptómicos y metabolómicos en clones contrastantes, con el objetivo de identificar genes clave, etapas críticas del desarrollo de la baya y relaciones entre la expresión génica y la acumulación de precursores y compuestos volátiles.

#### 4.2 Objetivos específicos

1. Realizar una comparación del contenido de norisoprenoides glicosilados entre los 8 clones comerciales de Vv cv. Tannat para determinar dos contrastantes por su mayor y menor cantidad.
2. Identificar en el genoma de Tannat los genes relacionados a la síntesis de norisoprenoides y sus precursores.
3. Identificar los periodos clave en la síntesis de norisoprenoides y expresión de genes relacionados en el desarrollo de la uva para determinar en cuales realizar los muestreos de esta investigación.
4. Identificar y cuantificar en las muestras los norisoprenoides libres y glicosilados y sus precursores (carotenoides) por GC-MS y HPLC-DAD.
5. Obtener ARN de calidad para secuenciar los transcriptomas de las muestras mediante abordaje RNA-Seq.
6. Explorar la relación entre la expresión génica y la acumulación de norisoprenoides glicosilados, libres y sus precursores en el transcurso del desarrollo de la baya y entre clones.

## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1. Selección de clones contrastantes en contenido de precursores aromáticos**

Para la selección de clones contrastantes en potencial aromático, se analizaron los datos obtenidos en una investigación previa utilizando las mismas técnicas analíticas que las desarrolladas en esta tesis (Nieto et al. 2023) donde se identificaron y cuantificaron los norisoprenoides glicosilados de las bayas de los 8 clones comerciales de Tannat introducidos a Uruguay (475, 717, 474, 794, 399, 472, 944, 378), en los periodos de vendimia 2016, 2017 y 2018 situados en el viñedo experimental del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, las Brujas). Estos datos fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y ordenados a través del test de Fischer con el Software Statistics (Zaiontz et al., 2019).

### **5.2. Identificación de genes asociados a la vía de síntesis de norisoprenoides y sus precursores**

Para identificar los genes asociados a la vía de síntesis de norisoprenoides se partió de la anotación funcional del genoma de Tannat (Da Silva et al. 2013) donde se seleccionaron los genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides (como precursores de norisoprenoides) y en norisoprenoides. La correcta anotación funcional de esos genes se verificó con la herramienta bioinformática BLAST (Boratyn et al. 2013) con el genoma de referencia de Vv cv. Pinot noir en la base de datos de ENSEMBL Plants (Dyer et al. 2025).

Adicionalmente se tomaron las secuencias de genes asociados a estas vías metabólicas de Vv en la base de datos de Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (Kanehisa et al. 2000) y del trabajo de Lin y colaboradores (2019). Se tomaron estas secuencias para realizar búsquedas de secuencias homologas en el genoma de Tannat mediante la herramienta bioinformática BLAST (Boratyn et al. 2013) para determinar si estaban presentes y si su anotación estaba actualizada.

### **5.3. Determinación de estadios clave en el desarrollo de la baya para el estudio de la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de norisoprenoides**

Para establecer los periodos en el desarrollo de la baya en los cuales los genes relacionados a la biosíntesis de norisoprenoides presentan cambios en su expresión, se analizaron los transcriptomas por RNA-Seq de la piel de las uvas del clon de Tannat 717 secuenciados en un trabajo previo (Da Silva et al. 2013, Da Silva 2016). Estos transcriptomas fueron secuenciados de bayas en los estadios: 1 semana después de floración (sdf), 5 sdf, 7 sdf, 10 sdf, durante envero analizando por separado bayas verdes y coloreadas, y a 15 sdf, en madurez enológica.

Estas muestras de ARN total fueron secuenciadas por triplicado por medio de la metodología de RNA-Seq con la tecnología Illumina en un secuenciador HiSeq 1000, en colaboración con la Universidad de Verona. Para esto se utilizó una librería *paired end* enriquecida en mRNA con insertos de 300 pb (según Da Silva et al. 2013). La calidad de los *reads* resultantes de la secuenciación se evaluó con el programa FastQC (Andrews n.d.) y su limpieza con Trimmomatic (Bolger et al. 2014), con parámetros por defecto. Posteriormente se realizó el mapeo de los *reads* contra el genoma de Tannat (Da Silva et al. 2013) con TopHat v2.0.4 (Trapnell et al. 2009) utilizando los parámetros por defecto. Los *reads* mapeados fueron contabilizados con HTSeq 0.6.1 usando el modelo "intersection-nonempty" (Anders et al. 2015).

Finalmente, los niveles de expresión a lo largo de la maduración de la baya, centrándonos en los genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides y norisoprenoides, fueron calculados usando el paquete de R DESeq2 (Love et al. 2014). Se consideraron genes con expresión diferencial (DEG) aquellos con valor de p-valor ajustado  $< 0.01$ . Para visualizar los resultados se crearon mapas de calor (*heatmaps*) utilizando el paquete de R pheatmap v 1.0.10 (Kolde et al. 2008)

## 5.4. Muestreo

Durante la vendimia 2019-2020 se realizaron 4 muestreos de los clones 717 y 474 en el viñedo de INIA-Las Brujas. El primero se realizó el 20/12/19 a 5 sdf (muestreo “G”), el segundo y tercero el 17/01/20 cuando las bayas se encontraban en envero, tomando por una parte un muestreo de bayas verdes (muestreo “EV”) y por otra las bayas rojas (muestreo “ER”). El cuarto muestreo se llevó a cabo el 04/03/20, periodo en el cual las bayas se encontraban en madurez enológica (muestreo “M”).

El muestreo de las bayas se realizó por triplicado para cada clon. Las mismas se tomaron al azar de distintas áreas del racimo en la extensión de la parcela del clon correspondiente. Se utilizaron tijeras para evitar dañar las uvas. No se colectó de las plantas de los extremos de las parcelas para eliminar el riesgo de contaminación de las muestras con uvas de clones diferentes.

En la Figura 4 se detalla la distribución de los clones en el viñedo. Para el clon 717 la muestra 1 corresponde a las bayas colectadas de las parcelas 2 y 9, la muestra 2; de las parcelas 23 y 28 y para la muestra 3; de las parcelas 33 y 43. Por otra parte, para el clon 474, la muestra 1 corresponde a las parcelas 4 y 16, muestra 2; a las parcelas 19 y 26, y para la muestra 3; a las parcelas 36 y 47. Las bayas se tomaron al azar de distintas áreas del racimo en la extensión de la parcela del clon correspondiente. No se colectó de las plantas de los extremos de las parcelas.

Una parte de las muestras fue llevada a Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) donde se tomaron entre 20 y 25 bayas y se les extrajeron la piel, las cuales fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C para su posterior extracción de ARN total. El resto de las bayas se transportaron al Laboratorio de Biotecnología de Aromas del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química, Udelar, donde fueron almacenadas a -20 °C para su posterior análisis de norisoprenoides y carotenoides.

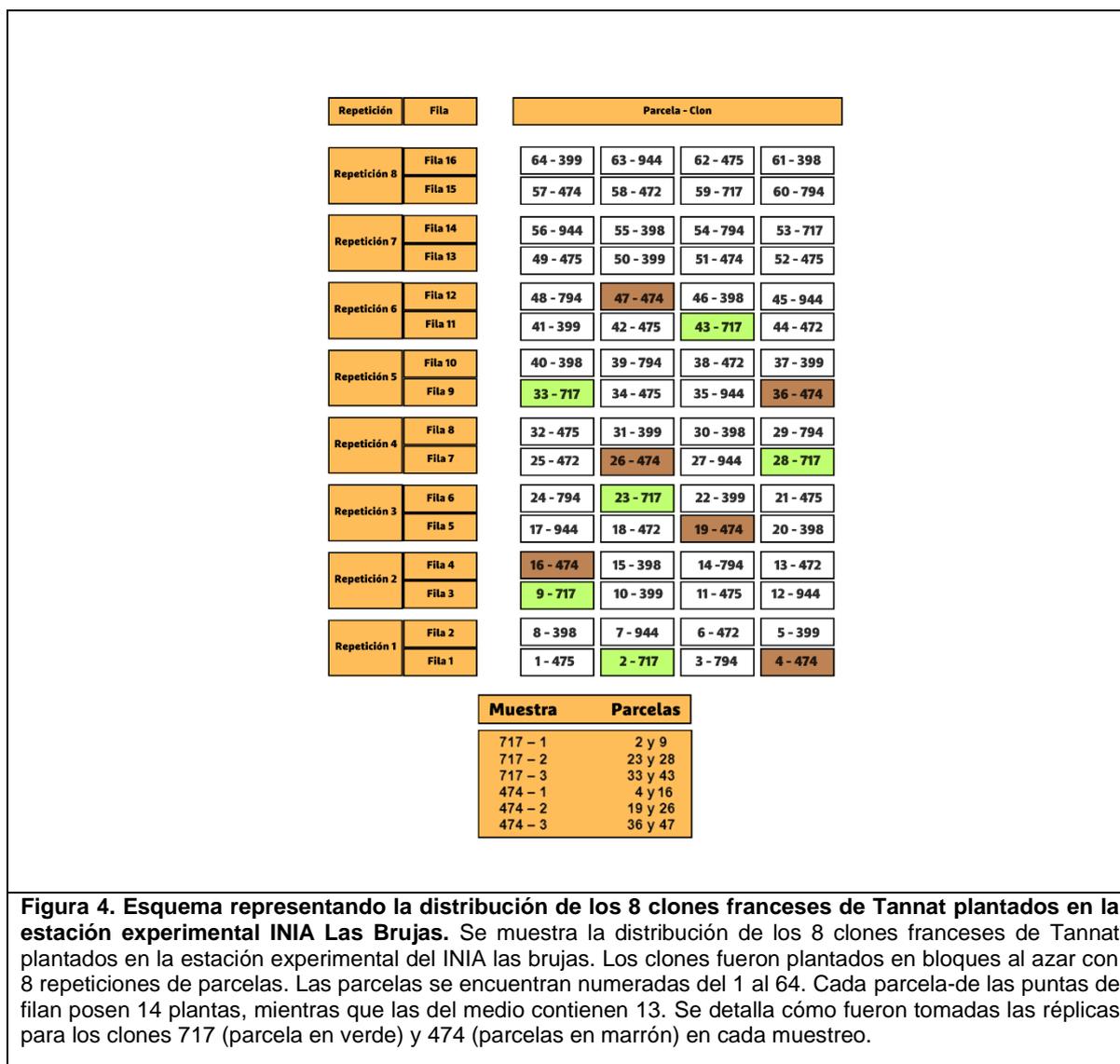


Figura 4. Esquema representando la distribución de los 8 clones franceses de Tannat plantados en la estación experimental INIA Las Brujas. Se muestra la distribución de los 8 clones franceses de Tannat plantados en la estación experimental del INIA las brujas. Los clones fueron plantados en bloques al azar con 8 repeticiones de parcelas. Las parcelas se encuentran numeradas del 1 al 64. Cada parcela-de las puntas de filan poseen 14 plantas, mientras que las del medio contienen 13. Se detalla cómo fueron tomadas las réplicas para los clones 717 (parcela en verde) y 474 (parcelas en marrón) en cada muestreo.

## 5.5. Análisis fisicoquímico de bayas

Para las muestras del primer, segundo y tercer muestreo, se determinó la masa de bayas promedio, azúcares reductores, pH y acidez total utilizando balanza, refractómetro, pH-metro y valoración con NaOH respectivamente. Debido a la elevada acidez de las bayas del primer muestreo, el ensayo para la determinación de acidez total no pudo llevarse a cabo. Para las

muestras del cuarto muestreo, la medición de los parámetros fisicoquímicos; alfa-aminoácidos, ácido málico, ácido tartárico, pH, acidez total, sólidos solubles totales (TSS), acidez volátil (VA) y densidad fue realizado utilizando espectroscopia del infrarrojo cercano (NIR).

## **5.6. Extracción, identificación y cuantificación de carotenoides por HPLC-DAD**

Se realizó la extracción de carotenoides de las muestras mediante extracción líquido-líquido y cuantificación e identificación por HPLC-DAD siguiendo las condiciones descritas por Crupi, et al. 2010.

Para la extracción, 50 gramos de bayas fueron adicionados de 25  $\mu$ L de BHA y congeladas en nitrógeno líquido. Inmediatamente fueron molidas con un mortero hasta obtener un polvo fino al cual se le adiciona 200  $\mu$ L de solución de estándar interno (8-apo- $\beta$ - carotenal) y 40 mL de agua. La extracción se llevó a cabo con 40 mL de hexano/dietil éter (1:1, v/v) agitando la mezcla por 30 minutos. La capa sobrenadante fue separada y el proceso de extracción se repitió con 20 mL de la mezcla de solventes. El extracto fue evaporado hasta sequedad utilizando un rotavapor y suspendido en 2 mL de acetona/hexano (1:1, v/v) y almacenado a -20°C hasta su análisis. Todas las operaciones fueron realizadas con baños de hielo y luz UV reducida para minimizar la isomerización y oxidación de carotenoides.

Para la cuantificación e identificación de carotenoides se empleó una columna de fase reversa C30 (3 mm, 4,6 x 150mm) (Dionex Bonded Silica Products - Thermo scientific). Las condiciones cromatográficas se detallan en la Tabla 1.

La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración con  $\beta$ -caroteno.

El análisis de componentes principales (PCA) de composición de carotenoides se realizaron el paquete de R prcomp y sus gráficos con ggplot2 (Wickham et al, 2016) y ggpubr (Kassambara et al, 2023).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y test de Fisher utilizando el software Statistics (Zaiontz et al., 2019).

**Tabla 1.** Condiciones empleadas en la identificación y cuantificación de carotenoides mediante HPLC-DAD (Crupi, et al 2010).

Fases móviles	Condiciones	Temperatura	Flujo	Volumen de inyección
A: Agua B: Metanol C: MTBE	40% A, 60% B; 0-5 min, 20% A, 80% B; 5-10 min, 4% A, 81% B, 15% C; 10-60 min, 4% A, 11% B, 85% C; 60-71 min.	25°C	1mL/min	20uL

## 5.7. Extracción, identificación y cuantificación de norisoprenoides glicosilados y libres por GC-MS

Se replicó la metodología descrita por Fariña et al. (2008) para la extracción y cuantificación de compuestos glicosilados en las bayas de Tannat. Se partió de 100 g de uvas, las cuales fueron adicionadas de 0,5 g de ácido glucónico y 50 uL de solución de estándar interno nonil-beta-glucopiranosido y 100 mL de etanol al 10%. La mezcla fue desintegrada y homogeneizada mecánicamente y se centrifugó a 4000 rpm y 10°C. Luego se filtró con lana de vidrio y se repitió el proceso dos veces más resuspendiendo la mezcla con 100 mL de etanol al 10% y centrifugando en las mismas condiciones.

Se utilizaron cartuchos de ISOLUTE® ENV+ rellenos con 1g de SDVB para retener los componentes glicosilados de la muestra procesada. Previo al pasaje de las muestras los cartuchos se acondicionaron con 20 mL de metanol y posteriormente 20 mL de agua destilada. A continuación, se introdujeron las muestras a través de los cartuchos y se posteriormente se lavaron con 15 mL de agua destilada para remover azúcares libres y/o otros componentes polares.

Los componentes libres se eluyeron mediante el agregado de 20 mL de diclorometano y posteriormente, con 30 mL de metanol se eluyeron los componentes glicosilados, los cuales fueron almacenados para posteriormente obtener su forma libre (aglicona) mediante hidrólisis enzimática. Todo el proceso de extracción se realizó utilizando un manifold y manteniendo el vacío para lograr una velocidad de elución constante durante toda la extracción. Previo a la hidrólisis enzimática el extracto metanólico obtenido de la extracción se rotavaporó hasta sequedad y luego se re-suspendiendo en 12 mL de buffer citrato pH 5 para luego ser incubado a 45°C durante 16 horas con una enzima beta-glicosidasa PCL-5 (DSM).

Finalmente, para extraer los componentes liberados durante la hidrólisis enzimática se empleó la misma metodología, pero con cartuchos ISOLUTE® ENV+ de menor tamaño (200 mg). Siguiendo el mismo principio de la primera etapa, estos se activaron con 9 mL de metanol seguido de 9 mL de agua destilada para luego recibir las muestras hidrolizadas. Los componentes aromáticos libres fueron eluidos con 3 mL de diclorometano, se secaron con sulfato de sodio y posteriormente se concentraron con una corriente de N<sub>2</sub> hasta un volumen menor a 100 µL para luego ser almacenados hasta su inyección en GC-MS.

Los extractos en el punto anterior se analizaron en un equipo Shimadzu GC 2010 Plus acoplado a un detector de masa Shimadzu QP 2020. Las condiciones cromatográficas fueron detalladas en la Tabla 2. La identificación de los norisoprenoides se realizó utilizando base de datos comerciales (Wiley, FFNy propias del laboratorio específicas para compuestos volátiles en uvas y vinos). La cuantificación de compuestos volátiles se realizó utilizando nonanol (a partir de la hidrólisis de nonil glicósido) como estándar interno.

Los norisoprenoides libres se determinaron mediante microextracción en fase sólida en espacio cabeza (HS-SPME) según la metodología reportada por Garde-Cerdán et al., (2018). Se mixearon 50 gramos de uva de los cuales se tomó 12 gramos en un vial de head space que contenía 2g de NaCl. Para la extracción se utilizó una fibra de SPME de fase DVB/Carbon-WR/PDMS de 50/30 µm de grosor y 10 mm de longitud (Restek). Las muestras se acondicionaron durante 15 min a una temperatura controlada de 60 °C con agitación constante (250 rpm). A continuación, se llevó a cabo la extracción durante 105 min manteniendo la agitación constante y la temperatura utilizada durante el acondicionamiento. Una vez concluido el proceso de extracción, la fibra de SPME que contenía los volátiles de las muestras se introdujo en el puerto de inyección. Todo el procedimiento se realizó en forma automatizada a través de un auto-inyector AOAC 6000 (Shimadzu). El cromatógrafo de gases acoplado a masa utilizado para el análisis de los volátiles fue el mismo que el mencionado para el análisis de componentes glicosilados así como también el programa de temperatura y las condiciones del GC-MS. La única variación con el método antes mencionado fue que se utilizó el modo splitless durante la inyección de la muestra y se dejó abierta la válvula de Split durante 2 minutos. La cuantificación se realizó con un estándar interno de 2-octanol.

**Tabla 2.** Condiciones cromatográficas de GC-MS para separación de norisoprenoides (Fariña et al, 2008).

Columna	Programa	Temperatura del inyector	Volumen inyectado	Gas carrier	Flujo	Fuente	Interfase
Carbowax 20M (30.0 m x 0.25 mm)	40 °C (8 min), 3 °C/min hasta 180 °C, 5 °C/min hasta	240 °C	1.0 µL	Hidrógeno	1,3 mL/min	200 °C	240 °C

	220 °C (20 min), 20 °C/min hasta 235 °C (15 min)						
--	--	--	--	--	--	--	--

El análisis de componentes principales (PCA) de composición de norisoprenoides se realizaron el paquete de R prcomp y sus gráficos con ggplot2 (Wickham et al, 2016) y ggpubr (Kassambara et al, 2023).

## 5.8. Extracción de ARN total y preparación para secuenciación

Se realizó la extracción de ARN total para las pieles de bayas utilizando el kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma Aldrich) adaptado con Plant RNA Isolation Aid (Thermo Fisher Scientific). La extracción se realizó siguiendo las especificaciones del proveedor con excepción de un paso extra al momento de eluir el ARN, donde se efectuó un segundo paso de elusión adicional para evaluar si se mantenían restos retenidos de esta molécula en las columnas del kit.

Para lograr obtener las cantidades y calidades de ARN total necesarias para su secuenciación, se llevaron a cabo más de tres extracciones por muestra, las cuales fueron combinadas para obtener tres réplicas de los clones en cada estadio.

A partir de las extracciones, se cuantificó el ARN y determinó la pureza a través de las relaciones de absorbancia A260/A280 (RNA ratio) y A260/A230 con un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Un valor de RNA ratio de 1,8 a 2,1 indica un ARN altamente purificado. Por otra parte, un valor entre 2,0 y 2,2 a una relación de absorbancias 260/230 indica un ARN limpio de compuestos orgánicos como carbohidratos o fenoles.

Cómo siguiente paso, utilizando un Bioanalyzer 2100 (Agilent) con RNA 6000 Nano Kit I (Agilent) se determinó la integridad del ARN, a través del RIN (RNA integrity number). Para asegurarse que se cumplan las especificaciones de la empresa de secuenciación; Macrogen Inc: Concentración mayor a 20 ng/μL; volumen mayor a 50 μL; cantidad total de ARN mayor a 1,0 μg; y un RIN mayor a 7,0.

Adicionalmente, se decidió evaluar la integridad de las extracciones a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% e hipoclorito al 4,2% (Aranda et al. 2012) (Anexo 3). En esta técnica

el uso de hipoclorito destruye las ARNasas evitando así la degradación del ARN de las muestras.

## **5.9. Procesamiento de resultados de secuenciación**

La secuenciación se llevó a cabo mediante tecnología Illumina en un secuenciador NovaSeq 6000, en Macrogen Inc. Se utilizó una librería paired end de 150 pb enriquecida en mRNA.

La calidad de los *reads* resultantes de la secuenciación se evaluó con el programa FastQC (Andrews n.d., Galaxy versión 0.74) y su limpieza con Trimmomatic (Bolger et al. 2014, Galaxy Version 0.39) con parámetros por defecto. Posteriormente se realizó el mapeo de los *reads* contra el genoma de Tannat (Da Silva et al. 2013) con RNA Star (Galaxy Version 2.7.11a) utilizando los parámetros por defecto. Los *reads* mapeados fueron contabilizados con HTSeq (Galaxy Version 2.0.5) usando el modelo “intersection-nonempty” (Anders et al. 2015).

Finalmente, los análisis de expresión diferencial fueron realizados con el paquete de R DESeq2 (Love et al. 2014). Se consideraron genes con expresión diferencial (DEG) aquellos con valor de p valor ajustado  $< 0.01$ . La expresión diferencial de estos genes fue evaluada para cada clon entre sus diferentes EdD y a su vez, comparando entre clones. Los análisis fueron focalizados en los genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides y norisoprenoides. Para visualizar los resultados se crearon heatmaps utilizando el paquete de R pheatmap v 1.0.10 (Kolde et al. 2008).

El análisis de componentes principales (PCA) para datos transcriptómicos se realizó basándose en matrices de conteo transformadas mediante regularized log transformation (RLD) utilizando el paquete DESeq2 (Love et al, 2014).

## **5.10. Integración de resultados transcriptómicos y metabolómicos**

Se analizó la relación entre el contenido de carotenoides y norisoprenoides, con la expresión de los genes diferenciales (DEGs) involucrados en la biosíntesis de estos compuestos, con el objetivo de identificar posibles patrones entre la expresión génica y la concentración de los compuestos. Se utilizó la normalización LFC para todas las comparaciones, y correlación lineal con el coeficiente de Pearson.

Los cálculos del coeficiente de Pearson se realizaron utilizando el paquete de R *cor.test* (Yu, et al. 2019) y se representaron gráficamente en *heatmaps* utilizando *ggplot2* (Wickham et al. 2016) y *ggpubr* (Kassambara et al, 2023). Se consideraron correlaciones positivas significativas a los valores de coeficiente  $r > 0.80$  y, significativos negativos  $r < 0.80$ .

## 6. Resultados y Discusión

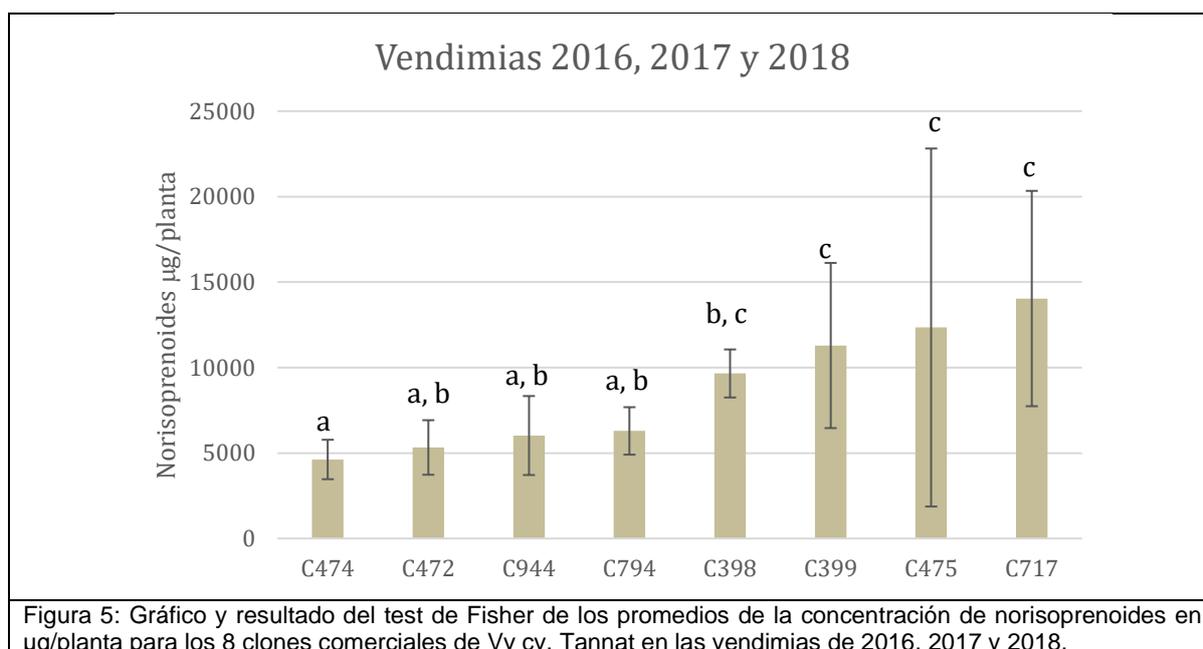
### 6.1. Selección de clones contrastantes en contenido aromático

En la Tabla 3 se muestran las concentraciones de norisoprenoides glicosilados totales cuantificados y normalizados por la carga del cultivo durante las vendimias del 2016, 2017 y 2018.

Si se observa el contenido de norisoprenoides glicosilados año a año durante el periodo estudiado, hubo diferencias significativas entre los clones 474 y 717 los años 2016, 2017 y 2018 (Nieto et al, 2023). El análisis mediante el test de Fischer para los norisoprenoides totales a lo largo de tres vendimias consecutivas reveló que los clones 717, 399 y 475 fueron los que presentaron mayor acumulación de estas moléculas, mientras que el clon 474 mostró el menor contenido (Figura 5). A partir de estos resultados, se seleccionó al clon 474 como contraste por su bajo contenido de norisoprenoides glicosilados, en comparación con el clon 717, uno de los que presentó mayores niveles. La elección del clon 717 se fundamentó además en que ha sido reportado como uno de los más productivos por Disegna et al. (2017), y en que se dispone de datos transcriptómicos previos para este clon (Da Silva et al., 2013), lo que permite comparar resultados y continuar la línea de investigación.

<b>Tabla 3.</b> Concentración promedio de norisoprenoides y su desviación media (D.M) para cada Clon en las vendimias de 2016, 2017 y 2018.						
<b>Clon</b>	<b>Norisoprenoides (<math>\mu\text{g/planta}</math>)</b>					
	<b>2016</b>		<b>2017</b>		<b>2018</b>	
	<b>Promedio</b>	<b>D.M</b>	<b>Promedio</b>	<b>D.M</b>	<b>Promedio</b>	<b>D.M</b>
<b>C475</b>	3996,81	236,98	12279,95	1915,54	20752,50	18034,80
<b>C717</b>	13341,83	1436,96	18280,85	7284,72	10491,90	7994,51
<b>C794</b>	4356,42	572,77	12819,92	2163,65	1711,03	878,97
<b>C474</b>	4734,84	715,02	7387,98	1795,14	1749,06	508,71
<b>C399</b>	12019,44	3253,56	16286,81	7413,17	5567,26	2115,30
<b>C472</b>	1222,30	146,33	12093,32	2747,46	2664,57	259,85

<b>C944</b>	4625,73	228,52	7665,37	3498,28	5786,04	1929,72
<b>C398</b>	1669,75	172,24	13539,60	1608,40	13757,78	1819,34



## 6.2 Identificación de genes asociados a la vía de síntesis de norisoprenoides y sus precursores

Se realizó la identificación de genes asociados a la biosíntesis de carotenoides y norisoprenoides en el genoma de Tannat (Da Silva et al. 2013) a partir de la información en la base de datos Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG, Kanehisa et al. 2000) por medio de la herramienta bioinformática BLAST (Boratyn et al. 2013). Se determinaron 24 genes, de los cuales 4 están implicados en la biosíntesis de norisoprenoides (dioxigenasas de escisión de carotenoides, CCD) y los 20 restantes de diversos carotenoides. Todos estos genes ya estaban identificados como tales en la anotación funcional del genoma de Tannat.

De las secuencias de genes involucrados en la vía de síntesis de norisoprenoides mencionados en el trabajo de Lin y colaboradores (2019) se encontraron 2 en el genoma de

Tannat (Da Silva et al. 2013). La anotación funcional de estos genes no estaba completa en este último genoma, por lo que se actualizó utilizando los datos de la publicación. Estos dos genes son: VIT\_13s0064g00810, VIT\_13s0064g00840 que corresponden a dioxigenasas de escisión de carotenoides (CCD).

Adicionalmente, se determinaron 3 genes involucrados en esta síntesis que estaban previamente identificados como tales en la anotación funcional de Tannat (Da Silva et al. 2013), pero no en la base de datos KEGG (Kanehisa et al. 2000). La anotación funcional de estos genes se corroboró utilizando la herramienta BLAST (Boratyn et al. 2013) contra la base de datos de ENSEMBL Plants (Dyer et al. 2025). Un gen; VIT\_04s0008g03510, corresponde a una dioxigenasa de escisión de carotenoides 9,10(9',10') (CCD1), mientras que los otros 2; VVV\_00195 y VIT\_13s0019g01270 a  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (BCH) y 15-cis-Fitoeno sintasa (PSY) respectivamente.

Cómo resultado se encontraron 7 genes codificantes de enzimas identificadas como involucradas en la biosíntesis de norisoprenoides y 22 de carotenoides, sus precursores (Tabla 4).

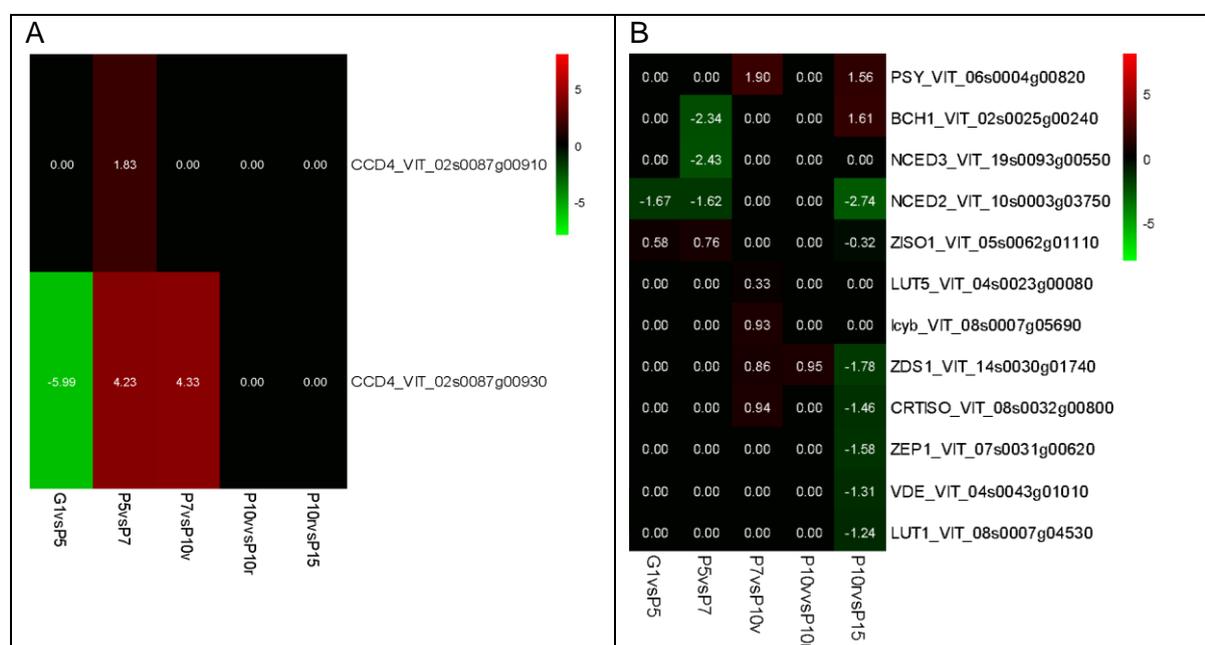
Compuesto	Nombre de Gen	Gen ID	Función	Número EC	Referencias
Carotenoides	BCH	VVV_00195	$\beta$ -caroteno 3-hidroxilasa	EC:1.14.15.24	Da Silva et al. 2013
	BCH1	VIT_02s0025g00240	$\beta$ -caroteno 3-hidroxilasa	EC:1.14.15.24	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	BCH2	VIT_16s0050g01090	$\beta$ -caroteno 3-hidroxilasa	EC:1.14.15.24	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	CCS	VIT_06s0080g00810	Sintasa de capsantina/capsorubina	EC:5.3.99.8	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	CRTISO	VIT_08s0032g00800	Carotenoide isomerasa	EC:5.2.1.13	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	GT	VIT_03s0063g00050	Abscisato beta-glucosiltransferasa	EC:2.4.1.17	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	LCYB	VIT_08s0007g05690	Licopeno $\beta$ -ciclaza	EC:5.5.1.19	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	LECY1	VIT_11s0016g01880	Licopeno $\epsilon$ -ciclaza	EC 5.5.1.18	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	LUT1	VIT_08s0007g04530	Caroteno $\epsilon$ -hidroxilasa	EC:1.14.14.158	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	LUT5	VIT_04s0023g00080	$\beta$ -anillo hidroxilasa	EC:1.14.-.-	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
NCED2	VIT_10s0003g03750	Dioxigenasa 9-cis-epoxicarotenoide	EC:1.13.11.51	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013	

Tabla 4. Genes involucrados en la biosíntesis de norisoprenoides y sus precursores en Vv. cv. Tannat

Compuesto	Nombre de Gen	Gen ID	Función	Número EC	Referencias
	NCED3	VIT_19s0093g00550	Dioxigenasa 9-cis-epoxicarotenoide	EC:1.13.11.51	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	NCED4	VIT_05s0051g00670	Dioxigenasa 9-cis-epoxicarotenoide	EC:1.13.11.51	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	PSY	VIT_06s0004g00820	Fitoeno sintasa	EC:2.5.1.32	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	PSY1	VIT_04s0079g00680	Fitoeno sintasa	EC:2.5.1.32	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	PSY2	VIT_12s0028g00960	Fitoeno sintasa	EC:2.5.1.32	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	PSY	VIT_13s0019g01270	15-cis-Fitoeno sintasa	EC:2.5.1.32	Da Silva et al. 2013
	VDE	VIT_04s0043g01010	Violaxantina de-epoxidasa	EC:1.23.5.1	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	ZDS1	VIT_14s0030g01740	ζ-caroteno desaturasa	EC:1.3.5.6	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	ZEP1	VIT_07s0031g00620	Zeaxantina epoxidasa	EC:1.14.15.21	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	ZEP2	VIT_13s0156g00350	Zeaxantina epoxidasa	EC:1.14.15.21	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	ZISO1	VIT_05s0062g01110	Zeta-caroteno isomerasa	EC:1.3.5.6	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
Norisoprenoides	CCD1	VIT_04s0008g03510	Dioxigenasa de escisión de carotenoides 9,10(9',10')	EC:1.13.11.71	Da Silva et al. 2013
	CCD1	VIT_13s0064g00810	Dioxigenasa de escisión de carotenoides 9,10(9',10')	EC:1.13.11.71	Lin et al. 2019
	CCD1	VIT_13s0064g00840	Dioxigenasa de escisión de carotenoides 9,10(9',10')	EC:1.13.11.71	Lin et al. 2019
	CCD4	VIT_02s0087g00910	Dioxigenasa de escisión de carotenoides	EC:1.14.99.n4	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	CCD4	VIT_02s0087g00930	Dioxigenasa de escisión de carotenoides	EC:1.14.99.n4	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	CCD4	VIT_16s0039g01370	Dioxigenasa de escisión de carotenoides	EC:1.14.99.n4	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013
	CCD7	VIT_15s0021g02190	Dioxigenasa de escisión de carotenoides	EC:1.13.11.68	Kanehisa et al. 2000, Da Silva et al. 2013

### 6.3 Determinación de estadios clave en el desarrollo de la baya para el estudio de la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de norisoprenoides

A partir de transcriptomas de las pieles de bayas del clon 717 de Tannat a lo largo de 5 estadios de desarrollo, secuenciadas en un trabajo previo (Da Silva et al., 2013, Da Silva 2016), se determinaron los DEGs relacionados con la síntesis de carotenoides y norisoprenoides (Figura 6).



**Figura 6.** Heatmap de expresión diferencial de genes codificantes de enzimas responsables de la síntesis de norisoprenoides (A) y carotenoides (B) para las etapas de desarrollo de la uva que corresponden a G1; una sdf, P5; cáscara de uva a 5 sdf, P7; pieles a 7 sdf, P10v; pieles verdes a 10 sdf, P10r; pieles rojas a 10 sdf, P15; pieles de uva madura a 15 sdf. Se consideran DEGs aquellos genes con un p-valor ajustado (padj) <0.01. Dentro de cada celda se muestra el nivel de cambio de expresión entre los estadios determinado en LFC.

En relación con la síntesis de norisoprenoides, las dioxigenasas de escisión de carotenoides (CCD4) muestran un aumento en su expresión a partir de las 7 sdf y mantienen sus altos niveles de expresión hasta la madurez de la uva. Por lo que se puede observar que en EdD avanzados, estos genes se encuentran con un nivel alto de expresión.

Con respecto a la síntesis de carotenoides, se observa una disminución significativa en la expresión del gen que codifica a NCED2 a las 5 sdf. A las 7 sdf, esta disminución se extiende a los genes codificantes de BCH1, NCED2 y NCED3. Ya para las 15 sdf, los genes codificantes de ZDS1, CRTISO, ZEP1, VDE y LUT1 también presentan una caída en sus niveles de expresión. Por otro lado, a las 10 sdf —cuando las pieles de las bayas todavía no han adquirido color— se registra un aumento en la expresión de genes que codifican enzimas como PSY, LUT, CRTISO, LCYB y ZDS1. Finalmente, a las 15 sdf se confirma una disminución generalizada en la expresión de varios genes clave de esta vía, incluyendo los que codifican para CRTISO, ZEP1, ZISO1, VDE, ZDS1, NCED y LUT1.

Estos resultados muestran que a lo largo del desarrollo de la baya hay una tendencia a la disminución de la expresión de los genes relacionados con la síntesis de carotenoides (precursores de norisoprenoides). Mientras que en los EdD más avanzados la tendencia es al aumento de la expresión de genes relacionados a la síntesis de norisoprenoides.

Esto nos permite determinar que los primeros EdD caracterizan la expresión de genes relacionados a la síntesis de carotenoides, mientras que los últimos EdD caracterizan la expresión de genes relacionados a la síntesis de norisoprenoides.

Cómo resultado, con el fin de estudiar los patrones de expresión de genes involucrados en la síntesis de carotenoides y norisoprenoides, se consideran realizar 4 muestreos:

A 5 semanas de floración (G), en envero tomando dos muestras; cuando la baya se encuentra aún en color verde (EV) y en rojo (ER), y en madurez enológica (M).

#### **6.4 Análisis fisicoquímico de las bayas**

Para las muestras G, EV y ER, se determinó la masa de bayas promedio, pH, y azúcares reductores, la acidez total utilizando balanza, pHmetro, refractómetro y valoración con NaOH, respectivamente (Tabla 5). Debido a la elevada acidez de las bayas del primer muestreo, el ensayo para la determinación de acidez total no pudo llevarse a cabo. Para las muestras del muestreo M, la medición de los parámetros fisicoquímicos; alfa- aminoácidos, ácido málico, ácido tartárico, pH, acidez total, sólidos solubles totales (TSS), acidez volátil (VA), densidad y azúcares reductores fue realizado utilizando espectroscopia del infrarrojo cercano (NIR) (Tabla 6).

**Tabla 5.** Resultados de los análisis fisicoquímicos (peso promedio de bayas, pH promedio, acidez total promedio y azúcares reductores promedio) para los clones 717 y 474 recolectados en los muestreos G, EV y ER.

<b>G</b>				
<b>Clon-réplica</b>	<b>Masa promedio de baya (g)</b>	<b>pH promedio</b>	<b>Acidez total promedio (g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L de jugo)</b>	<b>Azúcares reductores promedio Brix</b>
474-1	0,83	2,37	NA	4,53
474-2				
474-3				
717-1	0,58	2,41	NA	4,97
717-2				
717-3				
<b>EV</b>				
<b>Clon-réplica</b>	<b>Masa promedio de baya (g)</b>	<b>pH promedio</b>	<b>Acidez total (g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L de jugo)</b>	<b>Azúcares reductores promedio Brix</b>
474-1V	0,78	1,55	1,35	5,33
474-2V				
474-3V				
717-1V	0,83	1,61	1,73	5,07
717-2V				
717-3V				
<b>ER</b>				
<b>Clon-réplica</b>	<b>Masa promedio de baya (g)</b>	<b>pH promedio</b>	<b>Acidez total (g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L de jugo)</b>	<b>Azúcares reductores promedio Brix</b>
474-1R	1,31	1,52	1,49	6,13
474-2R				
474-3R				
717-1R	1,25	1,62	1,71	6,20

717-2R				
717-3R				

**Tabla 6.** Resultados promedio para cada clon de la medición de los parámetros fisicoquímicos; alfa- aminoácidos, ácido málico, ácido tartárico, pH, acidez total, sólidos solubles totales, acidez volátil, densidad y azúcares reductores del muestreo M.

M								
Muestra	Alfa amino promedio (mg/L)	Amonio promedio (mg/L)	Ácido málico promedio (g/L)	Ácido tartárico promedio (g/L)	pH promedio	Acidez total promedio (g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L de jugo)	Densidad promedio (g/mL)	Azúcares reductores promedio (Brix)
474-1	130,23	118,33	0,20	10,13	3,30	2.32	1,10	24,49
474-2								
474-3								
717-1	123,37	117,37	0,20	9,37	3,32	2.28	1,10	23,90
717-2								
717-3								

Los parámetros fisicoquímicos muestran para ambos clones valores similares por cada estadio. Esto indica que ninguno lleva un retraso o maduración acelerada con respecto al otro.

A su vez, tal como publican Razungles et al. (1998) y Mendes-Pinto et al. (2005), en los primeros estadios ambos clones presentan un pH bajo, que comienza a aumentar a medida que avanza la madurez. Este proceso ocurre en paralelo con un aumento marcado en la acumulación de azúcares reductores, en línea con lo establecido por Malacarne et al. (2024).

Los valores de pH y azúcares reductores de las bayas maduras en este estudio se encuentran dentro del promedio para ambos clones según lo determinado por Disegna et al. 2017 donde estudia estos parámetros recopilando datos desde la vendimia 2006 hasta 2010. Estos datos indican un desarrollo de las bayas de acorde a lo esperado según bibliografía y por lo tanto se continuó trabajando con estas muestras.

## 6.5. Extracción, identificación y cuantificación de carotenoides por HPLC-DAD.

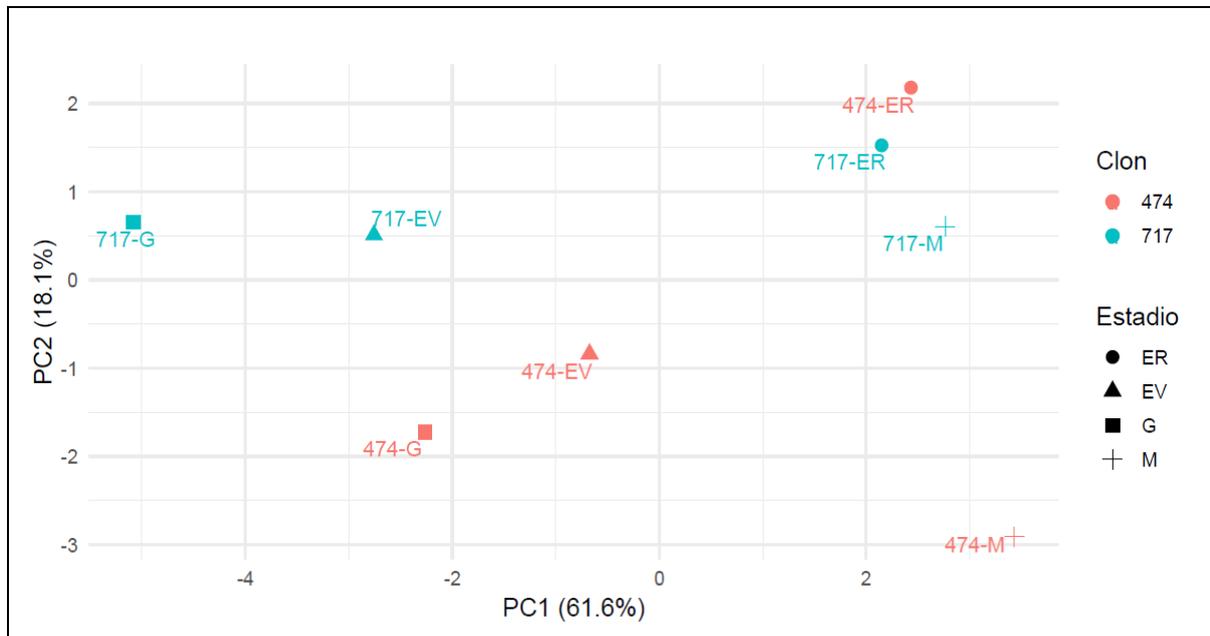
Mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) se lograron separar y cuantificar 16 carotenoides; 8R-neocromo, SR-neocromo, neoxantina, violaxantina, 8R auroxantina, luteoxantina, flavoxantina, crisantemaxantina, 8S auroxantina, zeaxantina, (9Z) o (9Z')-luteína, (9Z) o (9Z')-luteína, luteína,  $\beta$ -caroteno y dos estructuras no identificadas, una de ellas similar a luteína (Tabla 7).

En el Anexo 1a se muestran los tiempos de retención y longitudes de onda de los carotenoides identificados.

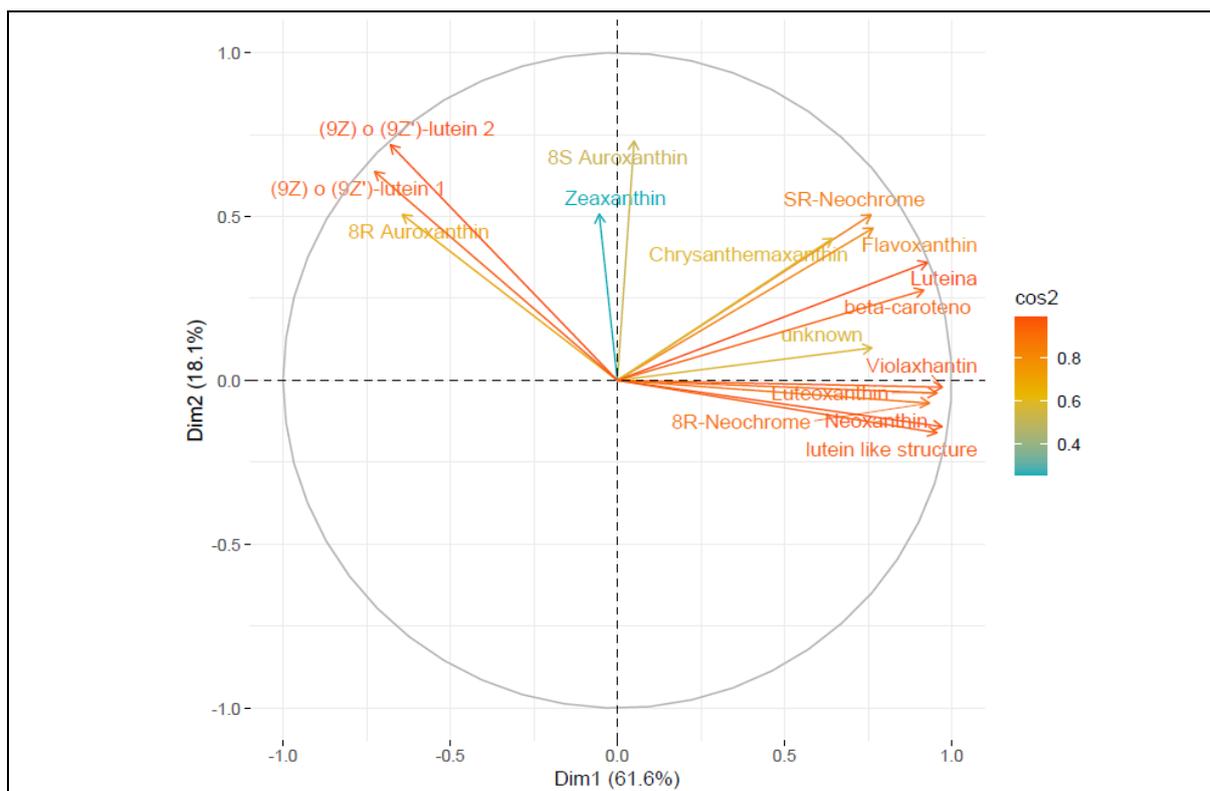
**Tabla 7:** Concentración expresada como  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno /kg de uva para cada uno de los 16 carotenoides identificados en los clones 717 y 474 en cada una de las etapas de maduración estudiadas durante la vendimia 2020. \* No identificado. m = media. ds = desviación estándar

Carotenoide	Clon 717 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ de uva)								Clon 474 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ de uva)							
	G		EV		ER		M		G		EV		ER		M	
	m	ds	m	ds	m	ds	m	ds	m	ds	m	ds	m	ds	m	ds
8R-Neocromo	13,6	6,0	10,4	11,4	1,1	0,6	1,3	1,3	12,3	1,2	2,2	1,3	1,0	1,0	0,2	0,1
SR-Neocromo	22,6	2,2	28,2	17,6	17,7	6,8	13,3	3,1	18,1	1,7	17,3	4,1	17,6	6,5	6,5	4,9
Neoxantina	52,9	5,6	32,4	22,0	5,4	3,3	6,8	1,6	42,8	2,2	33,1	0,7	5,9	2,8	2,8	1,1
Violaxantina	13,4	8,9	6,6	2,8	1,0	0,8	1,3	0,9	7,7	1,8	4,6	1,6	1,0	1,0	0,2	0,4
Carotenoide *	2,3	0,3	5,3	1,1	0,2	0,3	0,0	0,1	1,8	0,6	2,6	2,3	0,9	0,6	0,0	0,1
8R Auroxantina	3,5	1,0	3,3	1,4	5,4	2,7	8,7	3,6	2,8	0,5	2,1	0,6	6,6	2,6	4,1	0,6
Luteoxantina	8,0	1,4	6,3	1,9	1,6	1,1	0,7	0,3	5,6	1,1	6,7	1,3	1,4	0,2	0,2	0,2
Flavoxantina	4,2	0,8	2,1	1,3	1,7	1,6	1,5	0,8	1,6	1,7	1,3	0,4	1,7	0,3	0,5	0,2
Crisantemaxantina	2,3	1,3	0,5	0,7	0,9	0,7	0,8	0,6	0,8	0,8	0,7	0,7	0,8	0,7	0,1	0,1
8S Auroxantina	1,7	0,7	2,8	1,0	2,7	1,7	0,4	0,2	1,4	1,1	1,4	1,3	4,3	2,6	0,4	0,1
Estructura tipo luteína	24,2	2,6	20,5	1,0	0,0	0,0	6,0	1,9	19,1	1,4	10,5	9,1	0,0	0,0	2,3	0,7
Zeaxantina	5,0	0,6	7,0	1,2	7,4	3,4	6,5	4,4	3,8	0,7	8,7	5,5	6,0	3,5	3,7	1,1
(9Z) o (9Z')-luteína	1,2	0,3	1,2	0,1	5,2	1,4	5,2	4,7	0,8	0,1	1,4	1,0	4,9	1,2	1,9	1,5
(9Z) o (9Z')-luteína	0,8	0,3	1,6	0,6	3,5	1,5	3,6	2,1	0,4	0,2	1,1	0,1	4,8	1,7	1,4	0,7
Luteína	602,9	53,0	533,7	30,2	361,3	96,9	321,8	66,7	454,3	11,7	409,9	1,5	358,4	67,9	169,5	58,8
$\beta$ -caroteno	379,0	32,4	269,1	11,7	212,2	69,1	200,9	46,2	285,6	14,0	210,8	7,0	190,0	40,5	107,4	34,2
Xantofilas totales (sin luteína)	155,8	24,8	128,2	13,1	53,9	21,1	56,0	14,5	118,8	1,9	93,5	12,4	57,0	19,0	24,0	8,1

En la Figura 7 se muestra el análisis de componentes principales (PCA) del contenido de carotenoides de ambos clones en sus distintos EdD y en la Figura 8 la proyección de las variables.



**Figura 7.** Análisis de componentes principales (PCA) de contenido de carotenoides entre los clones 717 y 474 en sus distintos EdD



**Figura 8.** Variables proyectadas del análisis de componentes principales (PCA) de contenido de carotenoides entre los clones 717 y 474 en sus distintos EdD

El PCA explicó un 79,7% de la variabilidad total, donde PC1 representó el 61,6% y PC2 un 18,1% adicional. Se observaron agrupamientos claros por estadio a lo largo de PC1: las muestras G y EV se ubicaron en los valores negativos, mientras que ER y M lo hicieron en los positivos. Además, el orden de los estadios a lo largo de PC1 se mantuvo igual para ambos clones, aunque separados entre sí, con excepción del estadio ER, donde las muestras de ambos clones se agruparon más cercanamente.

Los compuestos  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina y luteoxantina fueron los que más contribuyeron a PC1, lo que indica que las diferencias en su contenido a lo largo del desarrollo de la uva explican gran parte de la distribución en ese eje. Por otro lado, zeaxantina y 8S-auroxantina mostraron baja contribución en PC2.

Se pudo observar que, del total de carotenoides cuantificados, el porcentaje de luteína y  $\beta$ -caroteno para los clones 717 y 474 fueron de 88.57% y 88.93% (Tabla 8). Estos valores son cercanos a los establecidos por Matei y colaboradores (2011), donde afirma que el contenido de los carotenoides nombrados previamente representa entre un 80 y 85% de los carotenoides en total para Vv. Es probable que en caso de que algunas xantofilas no hayan podido ser separadas por cromatografía, el porcentaje de luteína y  $\beta$ -caroteno sean un poco menores, acercándose más a lo establecido por la bibliografía previamente citada.

		Porcentaje del total de carotenoides			Porcentaje promedio		
		Luteína	$\beta$ -caroteno	Xantofilas (sin luteína)	Luteína	$\beta$ -caroteno	Xantofilas (sin luteína)
<b>Clon 717</b>	<b>G</b>	55,88%	32,69%	11,43%	55,88%	32,69%	11,43%
	<b>EV</b>	55,85%	32,68%	11,47%			
	<b>ER</b>	55,87%	32,83%	11,30%			
	<b>M</b>	56,28%	32,22%	11,50%			
<b>Clon 474</b>	<b>G</b>	56,46%	32,47%	11,08%	56,46%	32,47%	11,08%
	<b>EV</b>	57,64%	32,20%	10,15%			
	<b>ER</b>	57,77%	33,55%	8,69%			
	<b>M</b>	56,33%	35,71%	7,96%			

En la Tabla 9 se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) donde se muestra la significancia estadística (p value), la cual indica si las diferencias de carotenoides totales entre los clones son significativas. Cuando  $p < 0.05$ , se considera que los clones difieren estadísticamente en ese estadio.

	<b>Carotenoides totales</b>
	<b>P value</b>

	G	EV	ER	M
Entre Clones	0,01	0,00	0,88	0,04

Estos resultados muestran que hay una diferencia significativa en el contenido de carotenoides totales entre ambos clones en todos los estadios a excepción de las bayas rojas en envero (ER), donde, tal como se observó en el PCA y gráficos anteriores, alcanzan un nivel similar.

El clon 717 produjo un contenido significativamente superior en forma global respecto al clon 474 para b-caroteno ( $p \leq 0,01$ ) luteína ( $p \leq 0,01$ ), suma de xantofilas (excluyendo luteína) ( $p \leq 0,01$ ) y flavoxantina ( $p \leq 0,05$ ). Las Figuras 9, 10, 11 y 12 muestran la evolución del contenido de estos compuestos para cada clon a lo largo del proceso de maduración. En todos los casos se observa una mayor concentración de estas moléculas en el clon 717 en el EdD G y este comportamiento se mantiene al final del EdD en el estadio M (excepto para flavoxantina). Al observar la evolución de estos carotenoides durante los estadios intermedios del EdD las diferencias en general son graduales sin presentar significancia.

El descenso en la cantidad de carotenoides acumulados observados a lo largo de los EdD de la uva es de esperarse debido a los distintos roles que cumplen los carotenoides en las plantas (captación de la luz, disipación de energía, precursores de fitohormonas y de componentes volátiles), las mismas se sintetizan en los primeros estadios y luego se degradan a lo largo de los distintos EdD (Rodríguez-Bustamante et al. 2007).

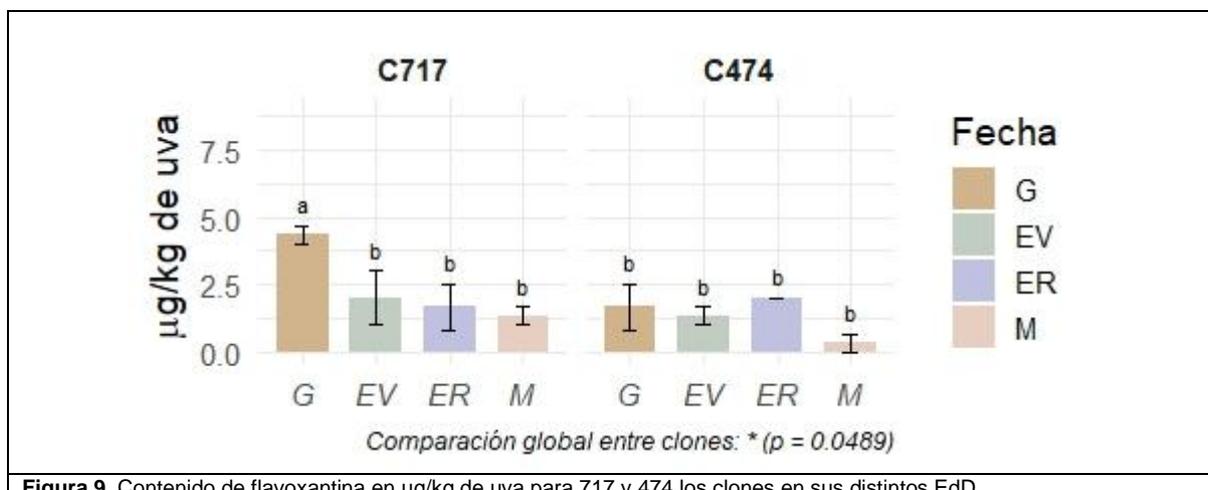


Figura 9. Contenido de flavoxantina en µg/kg de uva para 717 y 474 los clones en sus distintos EdD

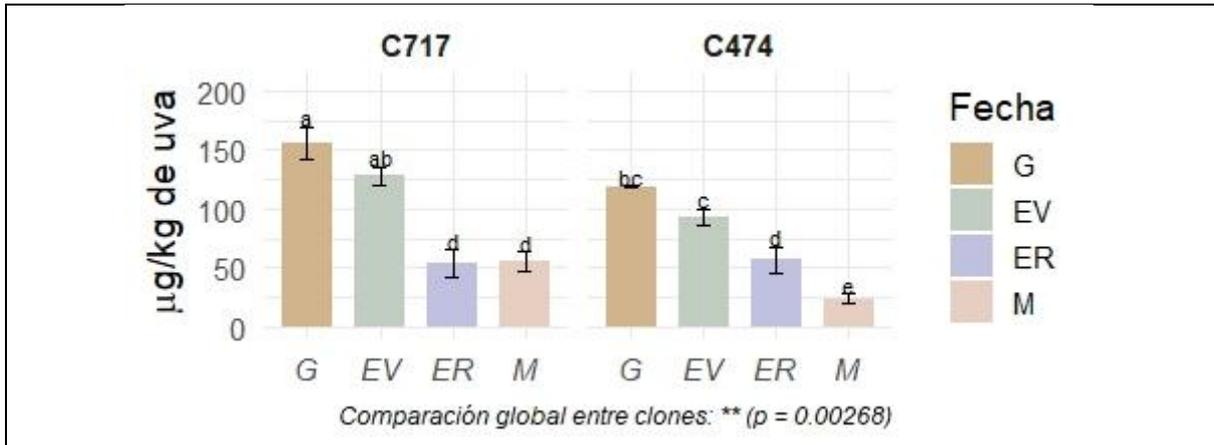


Figura 10. Contenido de xantofilas (sin incluir luteína) en  $\mu\text{g/kg}$  de uva para 717 y 474 los clones en sus distintos EdD.

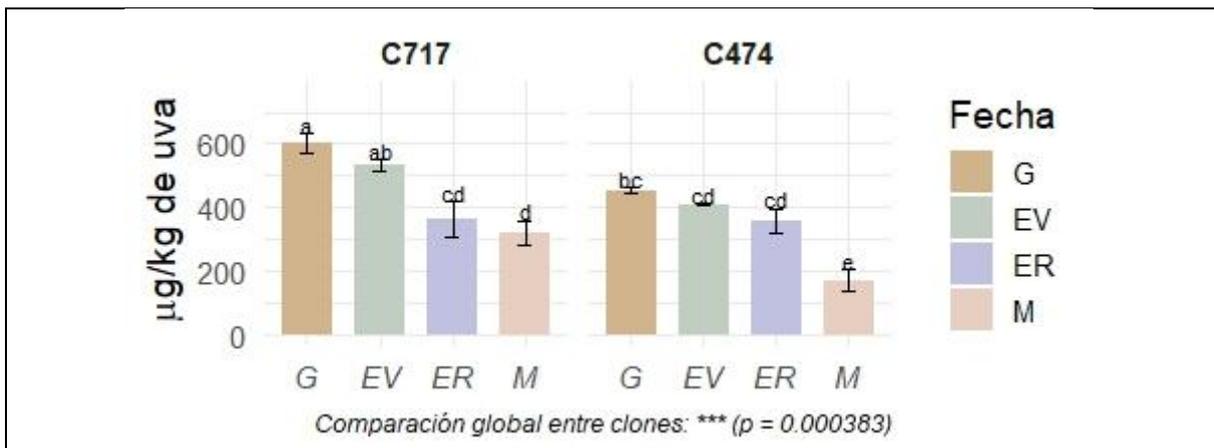


Figura 11. Contenido de luteína en  $\mu\text{g/kg}$  de uva para 717 y 474 los clones en sus distintos EdD.

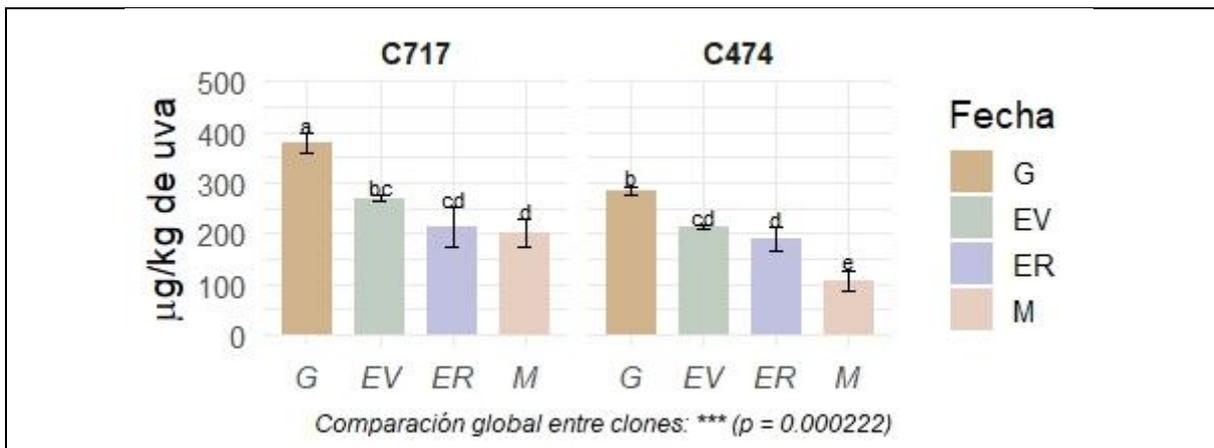


Figura 12. Contenido de  $\beta$ -caroteno en  $\mu\text{g/Kg}$  de uva para 717 y 474 los clones en sus distintos EdD.

La variación del contenido de luteína, xantofilas (sin luteína) y  $\beta$ -caroteno entre el periodo G y M se muestra en la Figura 13. donde se puede ver que a pesar de que hay diferencias significativas en los carotenoides totales, la cantidad de estos que se degradan en el desarrollo de las bayas es igual para ambos clones.

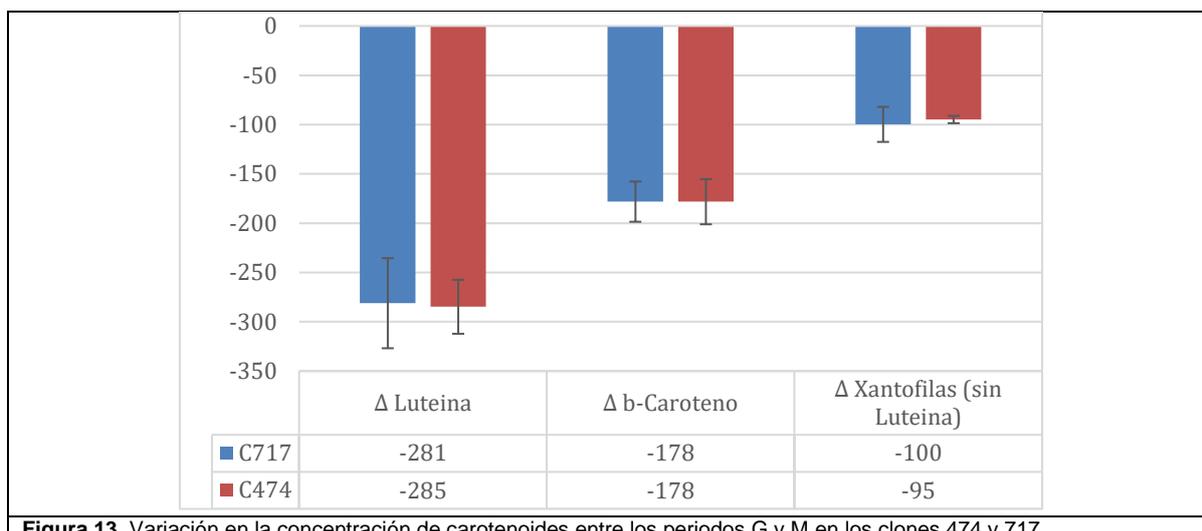


Figura 13. Variación en la concentración de carotenoides entre los periodos G y M en los clones 474 y 717.

## 6.6. Extracción, identificación y cuantificación de norisoprenoides glicosilados por GC-MS

Se identificaron y cuantificaron 10 norisoprenoides glicosilados; vomifoliol, 3-hidroxi-β-damascenona, 7,8-dihidrovomifoliol, 4-oxo-7,8-dihidroxi-β-ionol, 4-oxo-β-ionol, 3-oxo-7,8-dihidroxi-α-ionol 3-oxo-α-ionol, 3,4-dihidro-3-oxoactinidol II, 3,4-dihidro-3-oxoactinidol III y 3,4-dihidro-3-oxoactinidol I. Sus concentraciones en µg/kg de uva para cada EdD en cada clon se muestran en la Figura 14. Se puede notar que la acumulación de estos compuestos a lo largo de los EdD va aumentando a excepción del estadio de ER donde se observa una disminución.

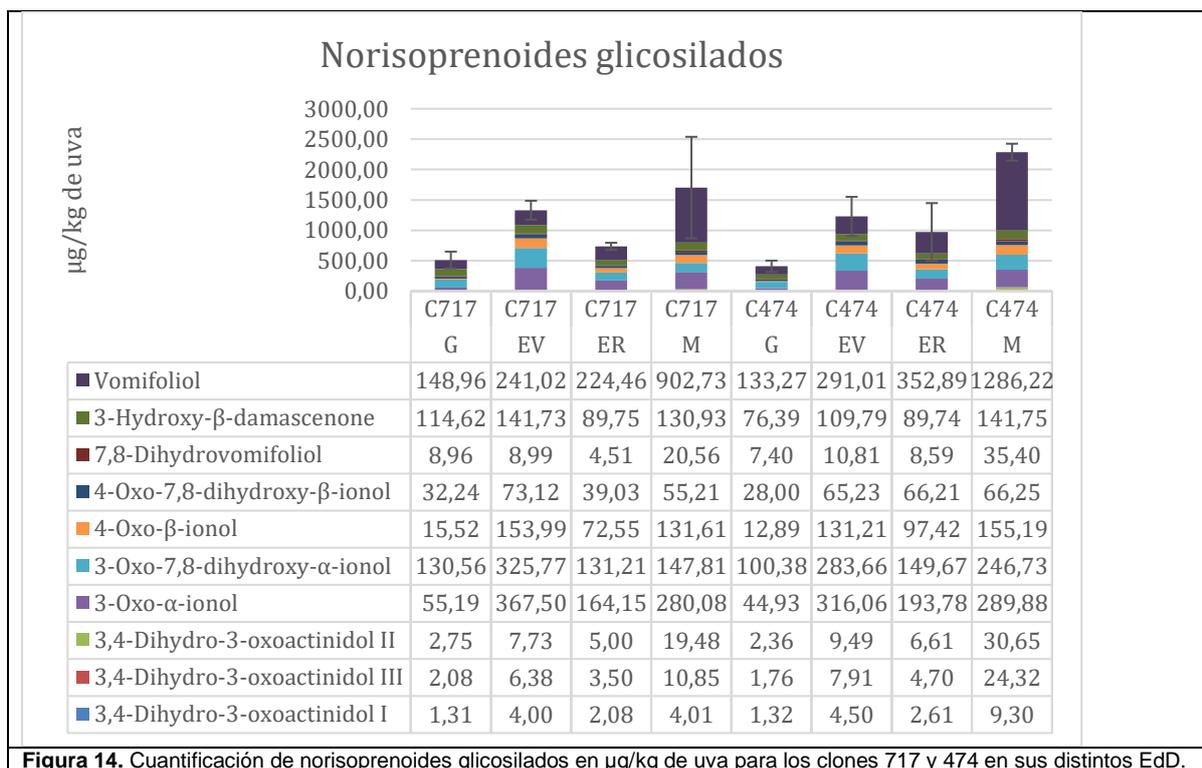
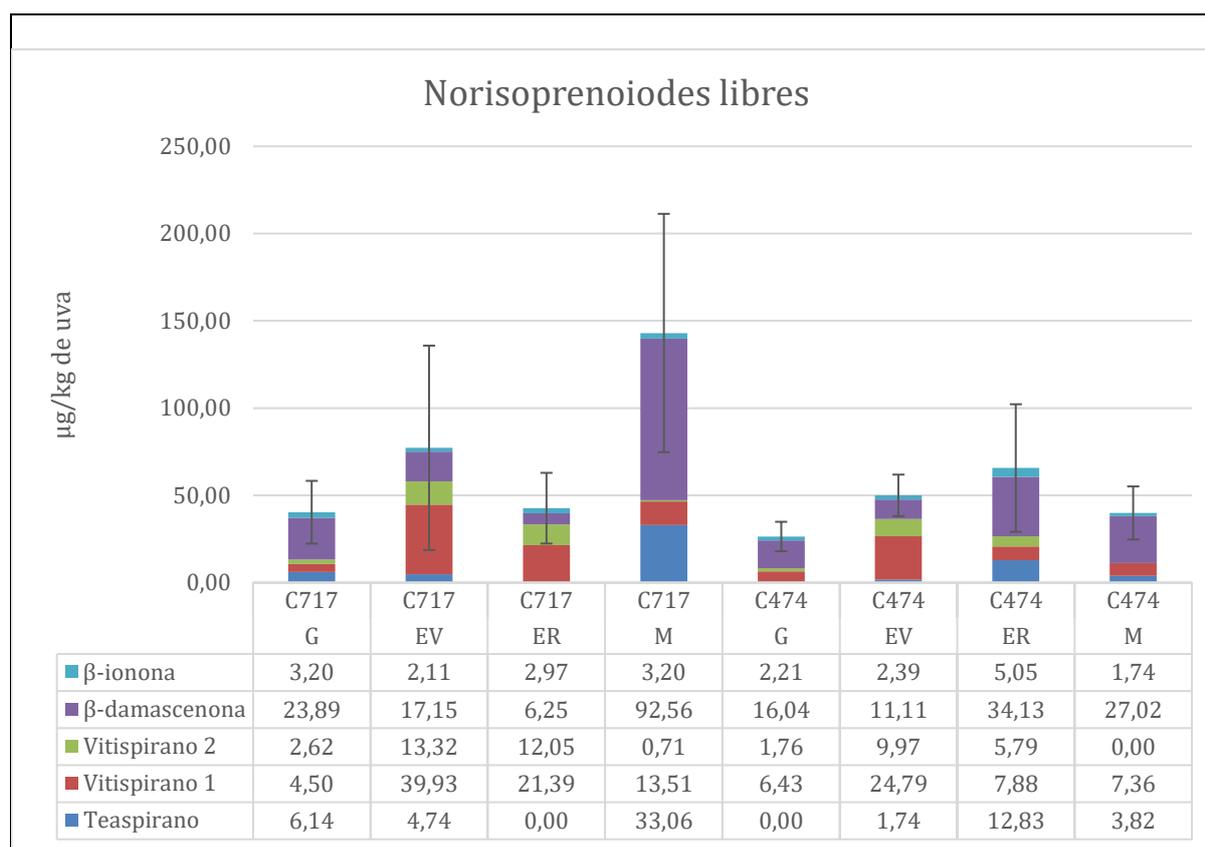


Figura 14. Cuantificación de norisoprenoides glicosilados en µg/kg de uva para los clones 717 y 474 en sus distintos EdD.

El análisis de varianza (Tabla 10) de los norisoprenoides glicosilados totales indica que no



**Figura 15.** Cuantificación de norisoprenoides libres en µg/kg de uva para los clones 717 y 474 en sus distintos EdD.

hay diferencias significativas entre clones en ningún estadio.

<b>Tabla 10.</b> Resultados del ANOVA de norisoprenoides glicosilados por EdD para los clones 717 y 474				
	<b>Norisoprenoides glicosilados totales</b>			
	<b>P value</b>			
	<b>G</b>	<b>EV</b>	<b>ER</b>	<b>M</b>
<b>Entre Clones</b>	<b>0,47</b>	<b>0,45</b>	<b>0,97</b>	<b>0,81</b>

Se lograron cuantificar 5 norisoprenoides libres en las muestras (µg/kg de uva); β-ionona, β-damascenona, vitispirano 1, vitispirano 2 y teaspirano (Figura 15).

El clon 717 muestra un aumento en la acumulación de estos compuestos a lo largo del crecimiento de la baya a excepción de ER donde muestra una disminución en la concentración. Por otra parte, el clon 474 aumenta la acumulación de estos compuestos hasta la madurez (M) donde los mismos bajan su concentración.

En el Anexo 1.b. se muestra el peso molecular, diagrama de molécula e índice de retención de Kovács para los norisoprenoides identificados y cuantificados.

El análisis de varianza entre clones (Tabla 11) muestra que en EV y M hay una diferencia significativa entre clones.

De todas formas, la contribución de norisoprenoides libres al contenido total de norisoprenoides es muy baja, por lo que no afectaría la significancia total.

Dado que los carotenoides son precursores de los norisoprenoides, el hecho de que ambos clones presentaran una cantidad similar de carotenoides degradados podría explicar por qué la acumulación total de norisoprenoides no tuvo diferencias significativas entre ellos.

Tabla 11. Resultados del ANOVA de norisoprenoides libres por EdD para los clones 717 y 474				
	Norisoprenoides libres totales			
	P value			
	G	EV	ER	M
Entre Clones	0,152	< 0.001	0,083	0,042

En la Figura 16 se muestra el resultado del PCA para los dos clones teniendo en cuenta los distintos EdD con foco el contenido de norisoprenoides totales. La proyección de las variables se muestra en la Figura 17.

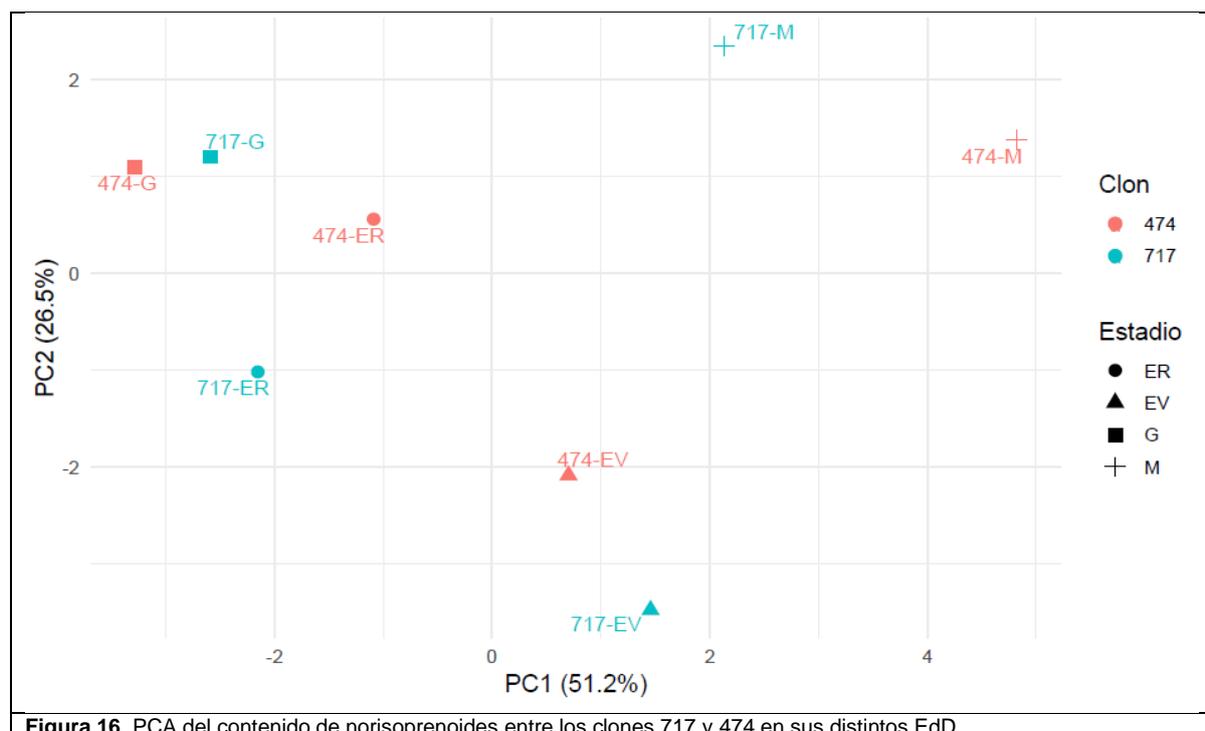
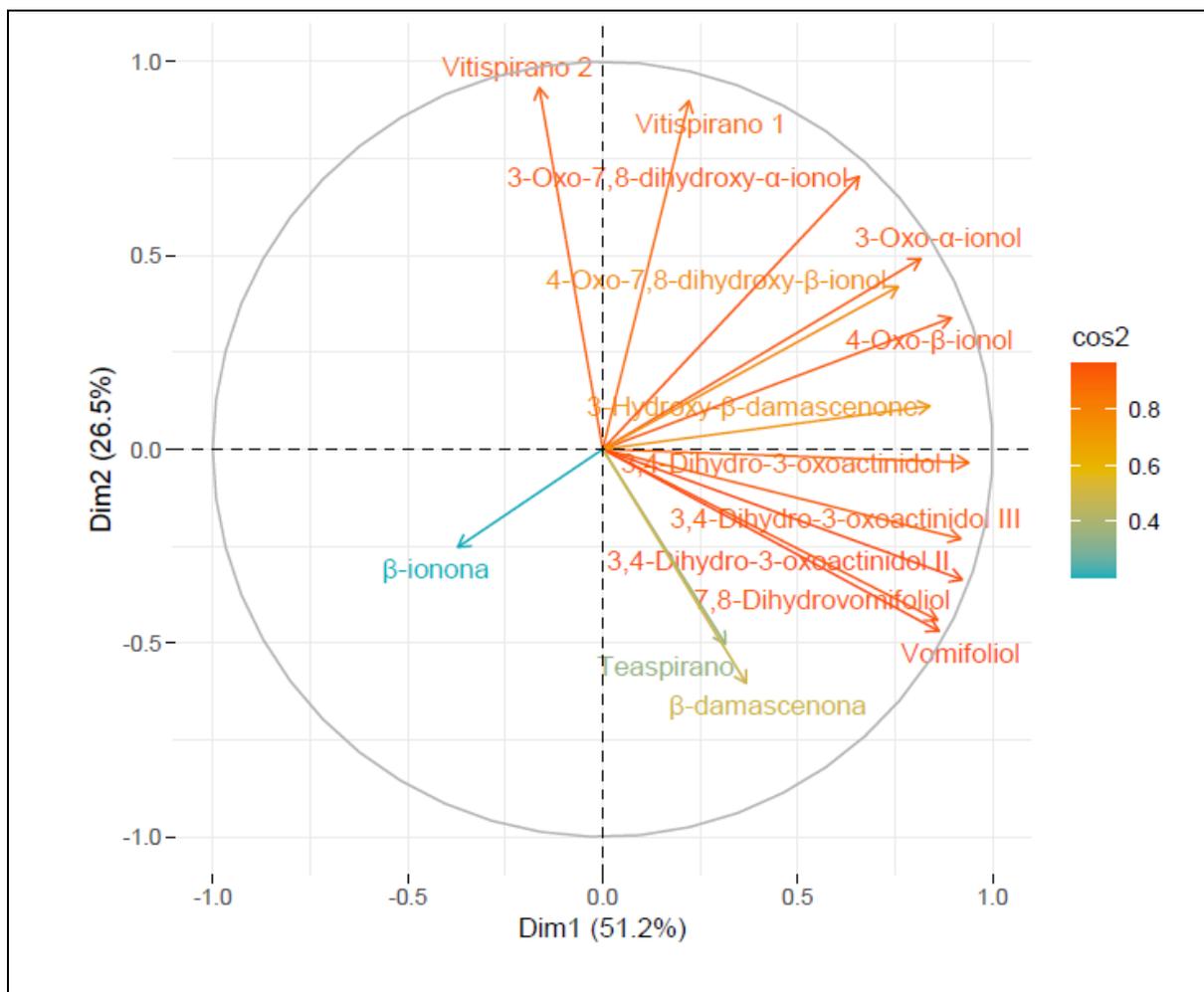


Figura 16. PCA del contenido de norisoprenoides entre los clones 717 y 474 en sus distintos EdD.

Los resultados del análisis de componentes principales explican un 77,7% de la variación total, con un 51,2% correspondiente al PC1 y un 26,5% al PC2.

Los agrupamientos se dan principalmente a lo largo del eje PC1, donde el estadio de madurez (M) se separa claramente del resto. A diferencia de un orden progresivo según el muestreo, G y ER aparecen más cercanos entre sí en valores negativos de PC1, mientras que EV y M se posicionan hacia valores positivos de ese eje.

Los compuestos 4-oxo- $\beta$ -ionol, 4-oxo- $\alpha$ -ionol, 3,4-dihidro-3-oxoactinidol III y I contribuyen fuertemente a PC1 y están negativamente correlacionados con  $\beta$ -ionona. Por otro lado, estos compuestos no presentan correlación con los isómeros I y II de vitispirano, los cuales tienen una alta contribución sobre PC2.



**Figura 17.** Proyección de variables del PCA del contenido de norisoprenoides entre los clones 717 y 474 en sus distintos EdD.

## 6.7. Extracción de ARN total y preparación para secuenciación

Los resultados de rendimientos de las extracciones se encuentran en el Anexo 2.a.

En la Tabla 12 se muestra la agrupación de las muestras para ser enviadas a secuenciar y los resultados de calidad generados por el equipo Bioanalyzer tanto en el IIBCE como en Macrogen INC.

Las muestras de ARN se identificaron de la siguiente manera: Clon – Número de extracción – Muestreo (primer muestreo: G, segundo muestreo de bayas verdes: EV, segundo muestreo de bayas rojas: ER, tercer muestreo en madurez: M). Las extracciones correspondientes a las muestras se etiquetaron con “1e” que refieren a la primera elusión realizada en la extracción del ARN.

La empresa de secuenciación logró generar librerías para todas las muestras a excepción de 717-1R M2, 717-3R M2 y 717-4R M2. Por esta razón se tuvieron que realizar nuevas extracciones de estos muestreos y un segundo envío con éxito a Macrogen INC. generando las librerías de las muestras 717-5R M2, 717-6R M2 y 717-7R M2. Se puede notar que la mayoría de las muestras que fallaron en la construcción de la librería son en envero rojo, por lo que se puede estimar que en ese periodo las bayas poseen algún metabolito que inhibe la generación de la librería.

**Tabla 12.** Muestras secuenciadas. Se detalla la agrupación de muestras enviadas a MACROGEN, y los resultados de calidad del ARN analizados en el IIBCE y en MACROGEN. Las muestras marcadas “ \* ” indican que no se pudieron realizar las librerías con ellas, mientras que las señaladas con “ \$ ” fueron enviadas posteriormente para suplir las anteriores.

Datos de Muestras		Bioanalyzer IIBCE			Bioanalyzer Macrogen			Cantidad Total (ug)
Nombre	Extracción	RNA Ratio	Concentración (ng/ul)	RIN	RNA Ratio	Concentración (ng/ul)	RIN	
474-1 G	474-1 G 1e	2.4	283	7.6	2.10	123.06	8.90	2.83
474-2 G	474-3 G 1e	2.0	241	8.6	2.00	84.15	8.80	1.94
474-4 G	474-7 G 1e	2.0	285	8.7	2.60	99.91	8.80	2.30
474-5 G \$	474-5 G 1e	N/A	N/A	N/A	3.30	96.48	7.90	2.21
717-1 G	717-2 G 1e	1.8	244	8.0	2.2	115.20	9.00	2.65
717-2 G	717-5 G 1e	2.1	202	8.3	2.20	193.50	8.90	4.45
	717-3 G 1e							
717-4 G	717-6 G 1e	1.8	294	8.5	2.30	149.16	9.00	3.43
474-2EV	474-3EV 1e	1.8	199	8.3	1.80	148.75	8.60	3.42
	474-10EV 1e							
474-3EV	474-4EV 1e	1.8	204	8.3	1.70	172.03	8.40	3.96
	474-5EV 1e							
474-4EV	474-8EV 1e	N/A	N/A	N/A	2.10	168.45	8.40	3.87
	474-6EV 1e							
717-1EV	717-4EV 1e	1.9	298	8.5	2.00	95.71	8.80	2.20
717-3EV	717-9EV 1e	2.1	195	7.8	2.20	127.74	8.80	2.94
	717-1EV 1e							
717-4EV	717-11EV 1e	2.0	217	8.5	2.20	168.18	8.70	3.87
	717-6EV 1e							

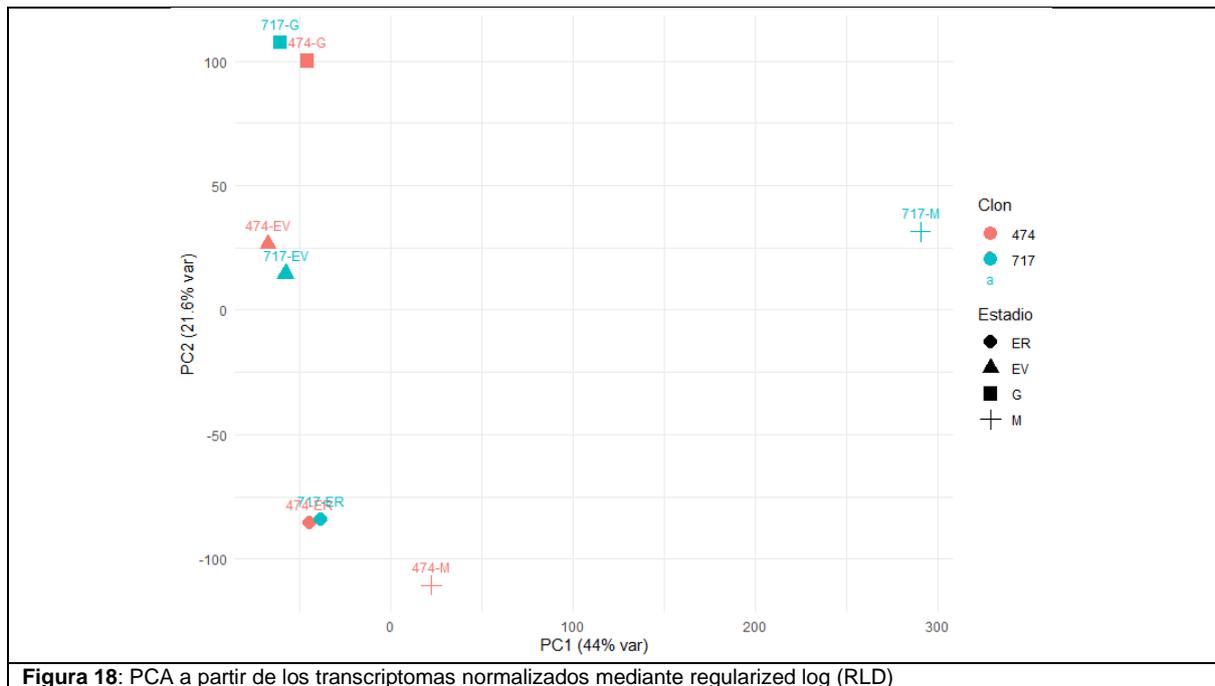
717-5EV \$	717-5EV 1e	N/A	N/A	N/A	1.80	243.52	8.70	5.60
474-1ER	474-1ER 1e	1.5	242	8.7	1.80	118.87	9.50	2.73
474-2ER	474-2ER 1e	1.7	140	9.6	1.70	169.81	9.50	3.91
	474-3ER 1e							
474-4ER	474-4ER 1e	N/A	N/A	N/A	2.20	252.41	9.00	5.81
	474-6ER 1e							
	474-6EV 1e							
717-1ER*	717-1ER 1e	1.7	270	8.8	2.20	123.58	9.00	2.84
717-2ER*	717-2ER 1e	N/A	N/A	N/A	1.50	129.86	9.70	2.98
717-4ER*	717-4ER 1e	1.7	248	9	2.10	72.30	8.90	1.66
717-5ER\$	717-5ER 1e	N/A	N/A	N/A	1.9	60.78	8.9	1.09
	717-7ER 1e							
	717-9ER 1e							
717-6ER\$	717-11ER 1e	N/A	N/A	N/A	2.0	213.42	8.7	3.84
	717-12ER 1e							
	717-13ER 1e							
717-7ER\$	717-6ER 1e	N/A	N/A	N/A	2.1	149.77	9.1	2.70
	717-15ER 1e							
	717-16ER 1e							
474-1 M	474-2 M 1e	1.9	90	8.6	2.20	114.64	8.40	2.64
	474-4 M 1e							
474-3 M	474-5 M 1e	1.8	89	8.6	2.10	102.86	8.70	2.37
	474-7 M 1e							
474-4 M	474-6 M 1e	2.4	88	8.6	2.00	89.88	8.50	2.07
	474-8 M 1e							
717-1 M	717-2 M 1e	3.3	78	8.1	2.20	109.60	8.50	2.52
	717-3 M 1e							
717-2 M \$	717-2 M 1e	N/A	N/A	N/A	1.90	223.83	8.40	5.14
717-3 M	717-6 M 1e	1.9	75	8.6	1.90	164.32	8.40	3.78
	717-4 M 1e							
	717-9 M 1e							
717-4 M	717-7 M 1e	3.6	91	8.2	2.10	117.09	8.60	2.69
	717-1 M 1e							

Todas las muestras que aprobaron el ensayo de integridad mediante electroforesis de agarosa con hipoclorito de sodio también cumplieron los requisitos mínimos de calidad establecidos por MACROGEN INC (fotos de geles en Anexo 2.b.). Esto podría sugerir que la primera técnica mencionada genera resultados confiables en cuanto a la integridad de las muestras.

## 6.8. Procesamiento de resultados de secuenciación

### 6.8.1. Análisis global del transcriptoma

En la Figura 18 se muestra el PCA del resultado de los transcriptomas normalizados por regularized log (RLD) para ambos clones en sus distintos EdD.



Los dos primeros componentes principales explican el 65,6% de la variación total (PC1: 44.0% y PC2: 21.6%). Se observa una separación clara entre estadios, principalmente a lo largo de PC2. Las muestras se agrupan por estadio, lo que indica que hay pocas diferencias entre los transcriptomas dentro de cada EdD (excepto en madurez, donde las diferencias son mayores).

Ambos clones en EV se agrupan cerca de las muestras del estadio G, lo que sugiere que en las etapas tempranas del desarrollo los transcriptomas todavía no presentan grandes diferencias. Sin embargo, entre EV y ER sí se observa una separación más clara, reflejando que durante el cambio de color de la baya ocurren modificaciones en los transcriptomas.

En el estadio M, el clon 474 se ubica cerca de ER, indicando que mantiene un perfil transcriptómico similar. Por el contrario, 717 en M se separa claramente de 474 y se posiciona del lado positivo de PC1 y PC2, lo que sugiere que en este estadio los transcriptomas de ambos clones presentan mayores diferencias.

El número de genes que presentó expresión diferencial entre los distintos EdD para cada clon y entre clones se observan en las Tablas 13 y 14 respectivamente. Se muestran los resultados divididos en dos categorías: DEGs que aumentan su expresión con respecto al estadio anterior (Sobreexpresados) y DEGs que disminuyen su expresión con respecto al estadio anterior (Subexpresados).

En la Figura 19 se muestran los diagramas de Venn donde se observa la intersección de DEGs sobreexpresados o subexpresados para cada caso mencionado anteriormente.

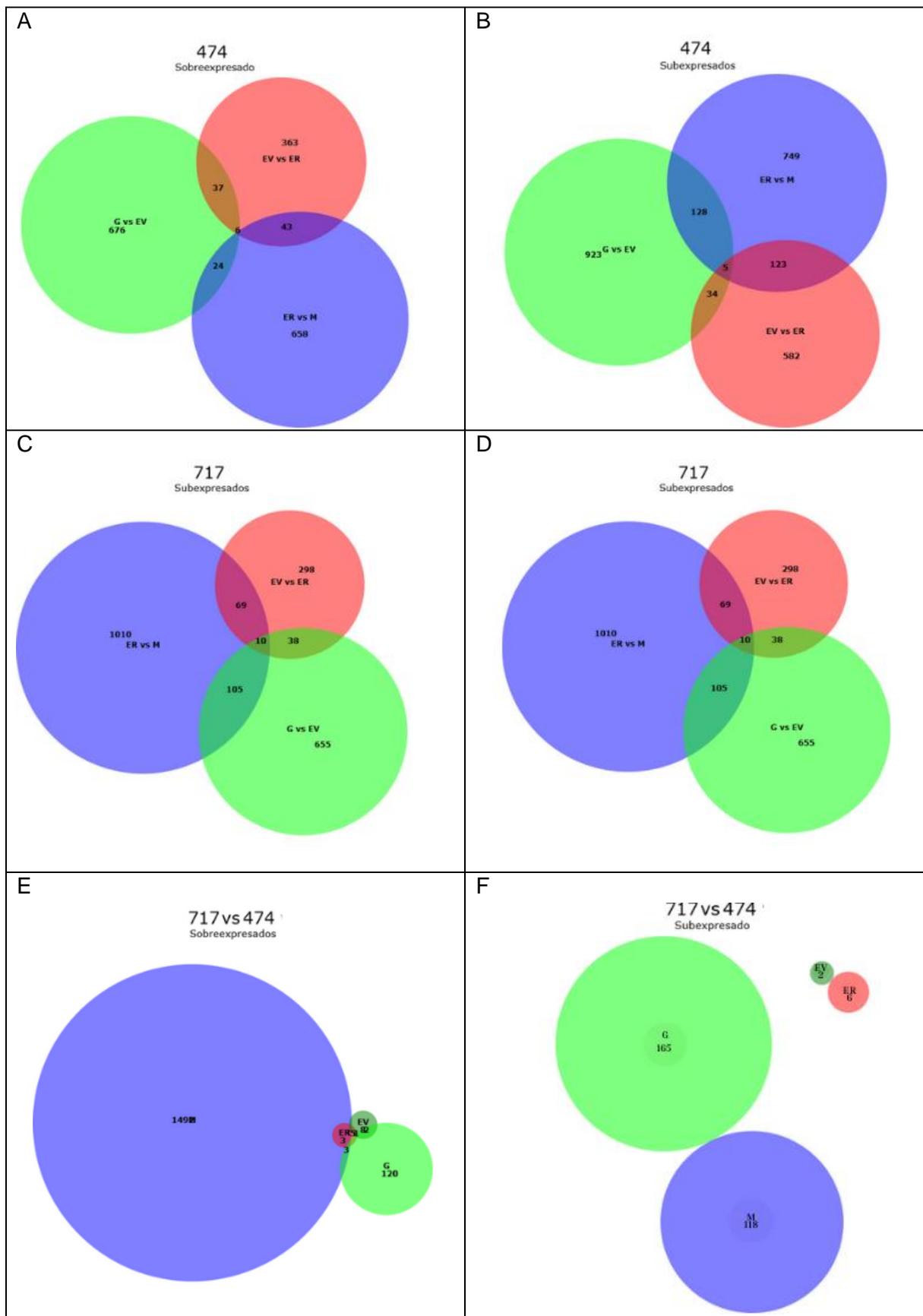
<b>Tabla 13.</b> Recuento de DEGs sobreexpresados y subexpresados para cada clon en sus distintos momentos de desarrollo						
	474			717		
	G vs EV	EV vs ER	ER vs M	G vs EV	EV vs ER	ER vs M
DEGs Sobreexpresados	743	449	731	681	231	2793
DEGs Subexpresados	1090	744	1005	808	415	1194
DEGs totales	1833	1193	1736	1489	646	3987

<b>Tabla 14.</b> Recuento de DEGs sobreexpresados y subexpresados comparando cada clon en sus distintos momentos de desarrollo				
	717 vs 474			
	G	EV	ER	M
DEGs Sobreexpresados	127	12	9	1499
DEGs Subexpresados	165	2	6	118
DEGs totales	292	14	15	1617

En el clon 474, los estadios con mayor cantidad de DEGs fueron G vs EV (1833 genes), lo que sugiere una mayor dinámica de expresión en las fases iniciales de desarrollo. En cambio, en 717, el estadio con más cambios transcriptómicos fue ER vs M, con 3987 DEGs.

En la comparación EVvsER en ambos clones se puede observar una similitud en el número de DEGs.

Las diferencias transcriptómicas entre 474 y 717 son menores durante G, EV y ER. Sin embargo, en madurez (M) se registran 1617 DEGs, lo cual muestra que las diferencias transcriptómicas entre clones se expresan con mayor fuerza en este EdD. Estas observaciones coinciden con las agrupaciones del PCA, donde los clones en sus EdD se agrupan por muestreo y se separan en M.

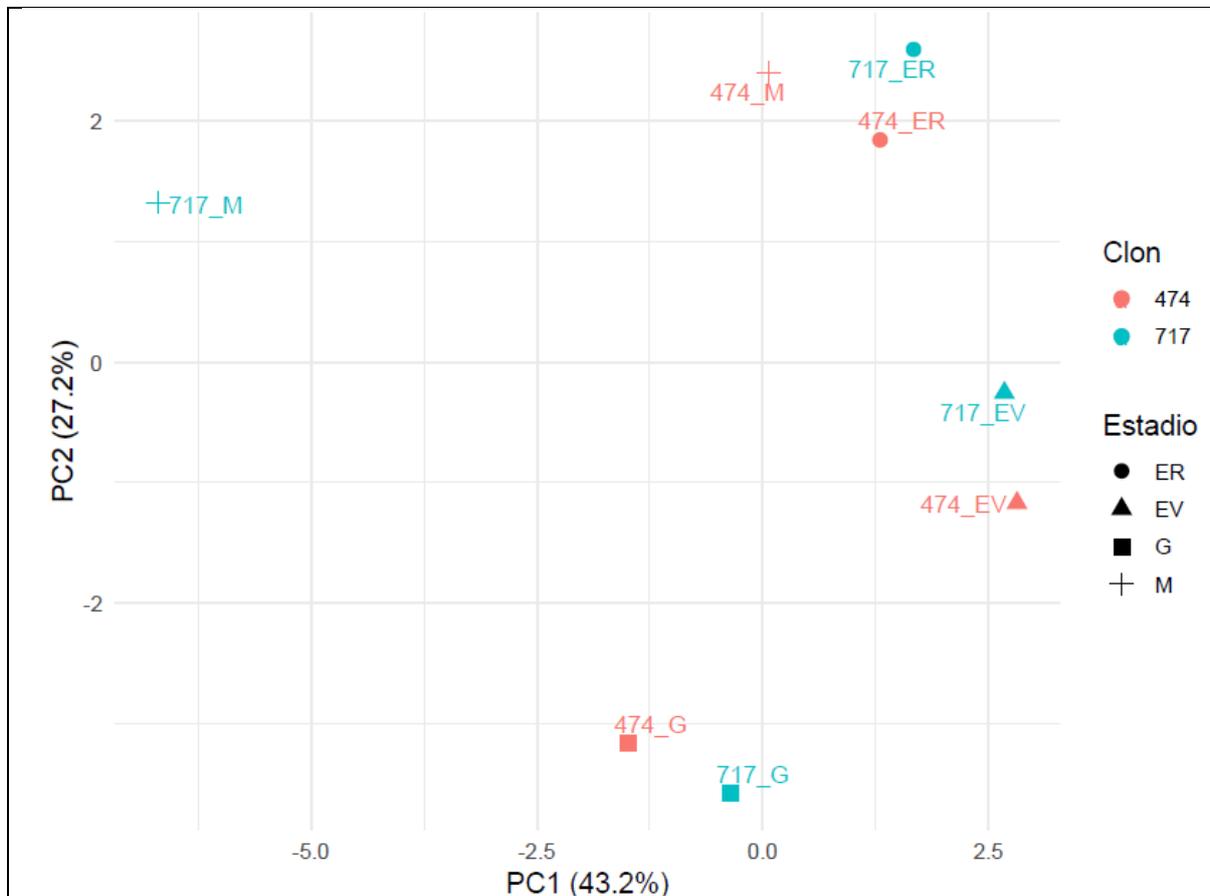


**Figura 19.** Diagramas de Venn donde se muestran la cantidad de DEGs sobreexpresados y subexpresados con sus distintas intersecciones entre los EdD cada clon y entre los clones. **(A)** DEGs Sobreexpresados en las comparaciones entre EdD en el clon 474. **(B)** DEGs Subexpresados en las comparaciones entre EdD en el clon 474. **(C)** DEGs Sobreexpresados en las comparaciones entre EdD en el clon 717. **(D)** DEGs Subexpresados en las comparaciones entre EdD en el clon 717. **(E)** DEGs Sobreexpresados en la comparación entre clones. **(F)** DEGs Subexpresados en la comparación entre clones.

## 6.9. Análisis de genes relacionados a la biosíntesis de carotenoides y norisoprenoides

### 6.9.1. Genes relacionados a la biosíntesis de carotenoides

Se muestra en la Figura 20 el PCA comparando el perfil de los genes relacionados a la biosíntesis de carotenoides normalizados por RLD de ambos clones en sus distintos EdD.

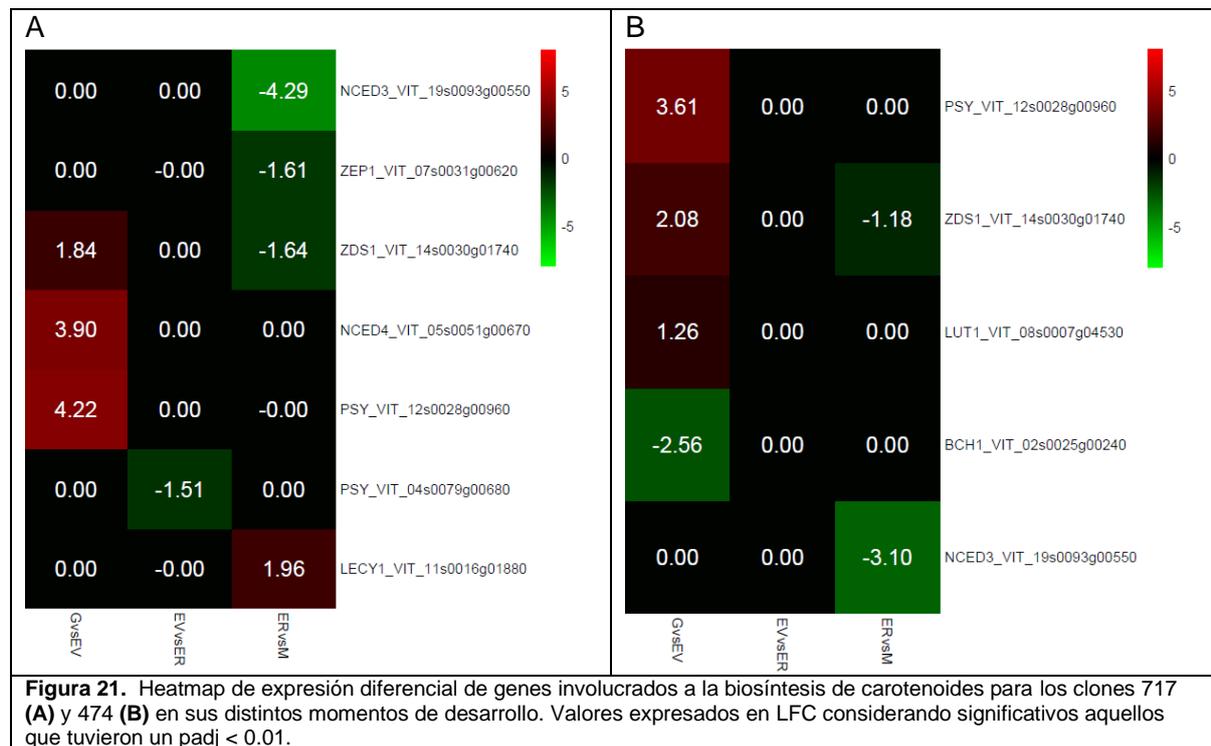


**Figura 20.** PCA de expresión génica normalizada por regularized logarithm RLD de genes relacionados a la biosíntesis de carotenoides en los distintos momentos de muestreo para los clones 717 y 474.

El 70,4% de la varianza fue explicada por los dos primeros componentes del PCA, con PC1 representando el 43,2% y PC2 un 27,2%. Se observan agrupamientos por estadios (G, EV y ER), distribuidos principalmente a lo largo del eje PC2.

Por otra parte, en el estadio de M se observa la mayor diferencia entre clones. 717-M se encuentra alejado del resto de las muestras, con valores negativos en PC1, mientras que 474-M se encuentra sobre el cero de PC1, más cerca de ER, lo que sugiere que el perfil de expresión en este clon cambia menos entre ER y M. Esta separación indica que, hacia el final del desarrollo, los genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides presentan una regulación diferencial más marcada entre clones. Lo que podría explicar la acumulación diferencial de estos componentes entre 717 y 474.

Los resultados de expresión diferencial de los genes involucrados en la síntesis de carotenoides expresados en LFC se muestran en *heatmaps* en la Figura 21 para los clones 717 (A) y 474 (B).



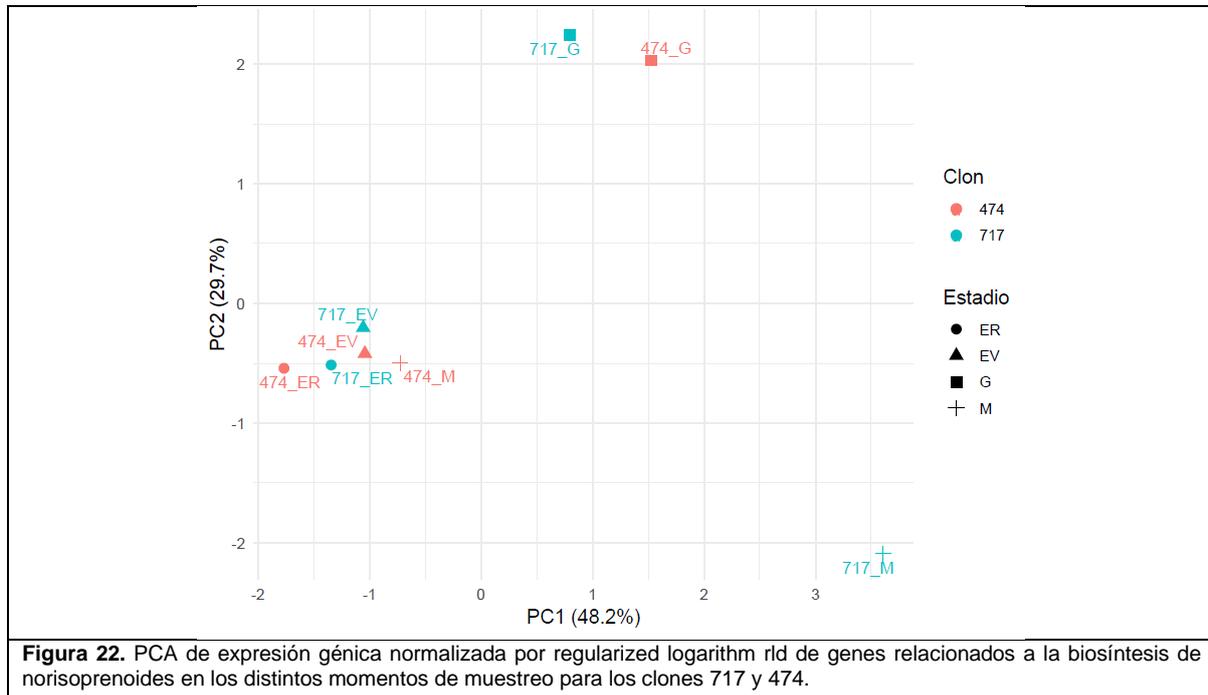
Los genes *VIT\_12s0028g00960*, *VIT\_19s0093g00550* y *VIT\_14s0030g01740*, que codifican para PSY, NCED3 y ZDS, respectivamente, muestran un patrón de expresión similar entre ambos clones. En particular, NCED3 y ZDS presentan un comportamiento comparable al observado en el transcriptoma secuenciado por Da Silva et al. (2013) y analizado en el capítulo 6.3, con la diferencia de que, en este caso, NCED3 disminuye su expresión en un estadio de desarrollo anterior.

Por otro lado, el gen que codifica a ZEP1 (*VIT\_07s0031g01740*) en el clon 717 también refleja un patrón de expresión similar al reportado por Da Silva et al. (2013). En contraste, *VIT\_02s0025g00240*, que codifica a BCH1, muestra en el clon 474 un patrón de expresión diferencial opuesto al registrado en dicho estudio.

Solo el gen *VIT\_08s0032g00800\_2* que codifica para una isomerasa de carotenoides (CRTISO) mostró una diferencia significativa entre el clon 717 y 474 en el estadio de madurez enológica, con un LFC de 5.20 ( $p_{adj} < 0.01$ ). Esto indica un nivel de expresión mayor en el clon 717 cuando la baya está madura. Pudiendo este ser un gen que codifica una enzima clave en la vía metabólica de síntesis de carotenoides, y, por tanto, un candidato que podría explicar las diferencias en la concentración de carotenoides entre clones.

## 6.9.2. Genes relacionados a la biosíntesis de norisoprenoides

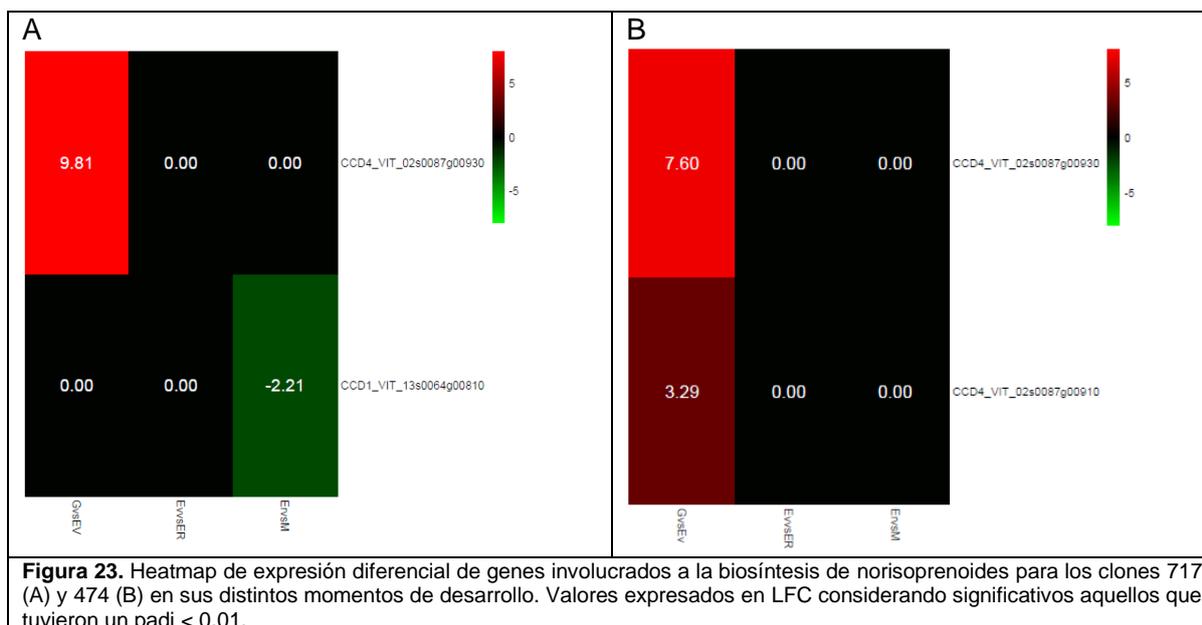
La Figura 22 muestra la comparación del perfil genes involucrados en la biosíntesis de norisoprenoides normalizados por RLD a través de un PCA.



**Figura 22.** PCA de expresión génica normalizada por regularized logarithm rld de genes relacionados a la biosíntesis de norisoprenoides en los distintos momentos de muestreo para los clones 717 y 474.

El análisis de componentes principales (PCA) explica un 77,9% de la varianza total, con un PC1 que representa el 48,2% y un PC2 que representa el 29,7%. La distribución de las muestras muestra a los estadios G de ambos clones agrupados en valores positivos de PC1 y PC2. En contraste, EV, ER y el clon 474 en M se agrupan en valores negativos de ambos componentes, lo que sugiere una baja diferenciación entre los transcriptomas en estos estadios, en lo que respecta a los genes relacionados con la síntesis de norisoprenoides. Por otro lado, el clon 717 en M se diferencia claramente, ubicándose en valores negativos de PC2 y positivos de PC1, indicando patrones diferentes de expresión de estos genes al alcanzar la madurez.

Los DEGs relacionados a la síntesis de norisoprenoides expresados en LFC para el clon 717 y 474 se representa en la Figura 23 (A) y (B) cómo *heatmaps*.



En los *heatmaps* se observa que el gen codificante para CCD4 (*VIT\_02s0067g00930*) presenta un patrón de expresión similar tanto en el clon 717 como en 474. Este mismo patrón también se refleja en el transcriptoma secuenciado por Da Silva et al. (2013) y analizado en el capítulo 6.3 de este trabajo. Además, en el clon 474, el gen *VIT\_02s0087g00910*, que también codifica una CCD4, muestra, al igual que en el transcriptoma secuenciado por Da Silva, et al (2013) el mismo comportamiento que los otros genes asociados a esta enzima.

Este patrón se caracteriza por un aumento en la expresión a partir del EdD EV. Siendo uno de los EdD principales, que coincide con los momentos de mayor acumulación de carotenoides. Este resultado podría respaldar lo propuesto por Timmins et al. (2020), quienes sugieren que en plantas, la degradación de carotenoides comienza con la acción de CCD4 para prevenir la acumulación de carotenoides potencialmente tóxicos. Por otra parte, no se identificaron DEGs relacionados con la biosíntesis de norisoprenoides entre los dos clones analizados en ninguno de los estadios de desarrollo evaluados. Esto indica que los niveles de expresión de estos genes son similares entre ambos clones, lo cual podría explicar la ausencia de diferencias significativas en el contenido total de norisoprenoides en la uva.

En el anexo 2.c. se adjunta el enlace con el archivo que contiene los datos procesados de los transcriptomas junto con la anotación G.O. de los genes de *Vv. cv Tannat*.



0.80), aunque no se observó una correlación clara con la luteína ni con el  $\beta$ -caroteno en ninguno de los dos casos.

En 474, el gen ZDS1 (*VIT\_14s0030g01740*), que codifica para la  $\epsilon$ -caroteno isomerasa —una enzima clave en la síntesis de carotenoides, responsable de la conversión de  $\epsilon$ -caroteno en licopeno— mostró una correlación positiva con luteína ( $r = 0.80$ ) y xantofilas (excepto luteína) ( $r = 0.96$ ), lo cual es esperable considerando que esta familia de compuestos representan una fracción importante de los carotenoides totales.

Por otro lado, en 717, el gen ZEP1 (*VIT\_07s0031g00620*), que cataliza la epoxidación de zeaxantina, presentó una correlación positiva con este carotenoide ( $r = 0.80$ ), lo que podría sugerir que a medida que se acumula zeaxantina, también aumenta la expresión de este gen. También en 717, el gen *VIT\_19s0093g00550*, codificante de la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED3), mostró una correlación negativa con uno de sus sustratos, violaxantina ( $r = -0.84$ ), lo cual resulta coherente, ya que esta enzima cataliza su degradación hacia la vía del ácido abscísico. En este contexto, un aumento en la expresión del gen estaría asociado a una disminución en la concentración de este carotenoide.

En relación al clivaje de carotenoides, en 717, el gen *VIT\_02s0087g00930* (CCD4) mostró correlaciones negativas fuertes con un carotenoide no identificado de estructura tipo luteína ( $r = -1.00$ ), flavoxantina ( $r = -1.00$ ) y 8S-auroxantina ( $r = -1.00$ ). En el clon 474, los genes diferencialmente expresados que codifican para CCD4 (*VIT\_02s0087g00930* y *VIT\_02s0087g00910*) presentaron un patrón similar, con correlaciones negativas elevadas con la estructura tipo luteína ( $r = -1.00$ ). Esto podría ser un indicio de que esta enzima está clivando estos carotenoides, ya que al aumentar la expresión del gen, disminuye la concentración del compuesto.

Con respecto a la síntesis de norisoprenoides, en 717, el gen CCD4 (*VIT\_02s0087g00930*) mostró correlaciones positivas con varios compuestos: vitispirano I ( $r = 1.00$ ), 4-oxo- $\beta$ -ionol ( $r = 0.90$ ), 3-oxo-7,8-dihidro- $\beta$ -ionol ( $r = 0.83$ ) y 3-oxo- $\alpha$ -ionol ( $r = 0.89$ ). En el clon 474, tanto este gen como *VIT\_02s0087g00910* (también codificante de CCD4) presentaron correlaciones positivas con los mismos compuestos, además de vitispirano II ( $r = 0.97$ ), lo que podría indicar que CCD4 estaría participando en la formación de estos norisoprenoides. El hecho de que en el clon 474 ambos genes presenten un patrón de expresión diferencial casi idéntico, podría explicar por qué las correlaciones con los metabolitos también son equivalentes.

En 717, el gen *VIT\_13s0064g00810*, codificante de CCD1, mostró una correlación negativa con  $\beta$ -caroteno ( $r = -0.90$ ), lo cual podría indicar que, al aumentar la expresión de este gen, se incrementa la degradación de  $\beta$ -caroteno por la enzima correspondiente.

Finalmente, no se observó una correlación entre los genes diferencialmente expresados que codifican para CCD y el número total de norisoprenoides. Esto podría deberse a que el modelo

de correlación lineal de Pearson no capta adecuadamente relaciones no lineales o multifactoriales propias del sistema biológico. Además, como plantean Mathieu et al. (2005), solo algunos pocos norisoprenoides se sintetizan directamente a partir del clivaje de carotenoides por la actividad de las CCD. El resto de los norisoprenoides son modificaciones de los primarios que se forman a través transformaciones físico-químicas mediadas por el ambiente u otras enzimas (como oxidasas o reductasas), o incluso por enzimas aún no caracterizadas.

Con el objetivo de explorar la relación entre la expresión génica y la acumulación diferencial de carotenoides entre los clones 717 y 474, se evaluó la correlación de Pearson entre el LFC de expresión del gen *VIT\_08s0032g00800\_2* que codifica a CRTISO y los LFC de concentración de distintos carotenoides, calculados para la misma comparación (717 vs. 474) en los distintos EdD (Tabla 15).

<b>Tabla 15.</b> Correlación de Pearson entre la expresión génica de <i>VIT_08s0032g00800_2</i> , que codifica a CRTISO y la acumulación diferencial de carotenoides entre los clones 717 y 474.	
<b>Carotenoides</b>	<b>Coefficiente de correlación de Pearson (r)</b>
Carotenoides totales	0.8974275
Violaxantina	0.9692997
Neoxantina	0.9560567
Xantofilas (sin luteína)	0.9415901
Luteoxantina	0.9383457
β-caroteno	0.8762028
Crisantemaxantina	0.8681356
SR.Neocromo	0.7756477
8R Auroxantina	0.7297798
8R Neocromo	0.6805743
Flavoxantina	0.6456488
8S Auroxantina	-0.1201365
Luteína	-0.1201365
Carotenoide S/l	-0.7557139
Carotenoide similar a luteína	-0.1201365
Zeaxantina	-0.1201365
(9Z)o(9Z') Luteína	-0.1201365

Los datos obtenidos a partir de esta correlación muestran una fuerte relación lineal entre la expresión del gen *VIT\_08s0032g00800\_2* (que codifica para CRTISO) y la acumulación de carotenoides totales ( $r = 0.89$ ). Al observar esta relación por metabolito, se observa una

correlación positiva con  $\beta$ -caroteno ( $r = 0.87$ ) y con el grupo de xantofilas (excluyendo luteína) ( $r = 0.94$ ), los cuales constituyen una porción significativa del total de carotenoides. También se hallaron correlaciones positivas con violaxantina ( $r = 0.96$ ), neoxantina ( $r = 0.95$ ), luteoxantina ( $r = 0.93$ ) y crisantemaxantina ( $r = 0.88$ ).

No se encontraron correlaciones significativas negativas entre la expresión de este gen y la acumulación de carotenoides. Estos resultados podrían contribuir a explicar la acumulación diferencial de carotenoides observada entre los clones 717 y 474, y sugieren un posible rol clave de CRTISO en dicha variación.

## 7. Conclusiones

Se identificaron dos clones de VV cv. Tannat contrastantes en cuanto al contenido de norisoprenoides glicosilados.

Se lograron identificar 22 genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides y 7 genes asociados a la biosíntesis de norisoprenoides, entre los cuales dos no se encontraban anotados previamente en el genoma de esta variedad.

El análisis de expresión génica mostró que los genes implicados en la síntesis de carotenoides presentan una mayor expresión en los primeros estadios del desarrollo del fruto, disminuyendo hacia la madurez enológica. Por otra parte, los genes codificantes de carotenoide dioxigenasas (CCD) mostraron un aumento de expresión a partir del envero y se mantuvieron activos durante la maduración.

Los parámetros fisicoquímicos de las muestras analizadas fueron adecuados para los estadios de desarrollo en que fueron tomadas, en concordancia con lo esperado para la variedad Tannat. Esto indica una maduración sincrónica entre los clones estudiados en estos parámetros clásicos de madurez utilizados en bodega.

Se logró la separación y cuantificación de 16 carotenoides:  $\beta$ -caroteno, 14 xantofilas (8R-neocromo, SR-neocromo, neoxantina, violaxantina, 8R-auroxantina, luteoxantina, flavoxantina, crisantemaxantina, 8S-auroxantina, zeaxantina, (9Z)/(9Z')-luteína, luteína y una estructura no identificada similar a luteína), así como una estructura no caracterizada. En el estadio de madurez, se encontraron diferencias significativas en el contenido total de carotenoides entre clones, siendo 717 el que presentó mayor acumulación. En particular, se observaron diferencias significativas en  $\beta$ -caroteno, flavoxantina, luteína y el conjunto de xantofilas (excluyendo luteína). A pesar de estas diferencias en acumulación, la cantidad total de carotenoides degradada fue equivalente entre los clones.

En cuanto a los norisoprenoides, se identificaron y cuantificaron 10 compuestos glicosilados (vomifoliol, 3-hidroxi- $\beta$ -damascenona, 7,8-dihidrovomifoliol, 4-oxo-7,8-dihidro- $\beta$ -ionol, 4-oxo- $\beta$ -ionol, 3-oxo-7,8-dihidro- $\alpha$ -ionol, 3-oxo- $\alpha$ -ionol, 3,4-dihidro-3-oxoactinidol I, II y III) y 5 compuestos libres ( $\beta$ -ionona,  $\beta$ -damascenona, vitispirano I, vitispirano II y teaspirano). No se encontraron diferencias significativas en su acumulación entre los clones, lo cual coincide con la similitud en la cantidad de carotenoides degradados. Esta observación, sumada a la

ausencia de genes diferencialmente expresados vinculados a la síntesis de norisoprenoides y al hecho de que ambos clones se encontraban cultivados bajo las mismas condiciones climáticas, podría explicar la similitud en el contenido de norisoprenoides entre ellos.

Se compararon los resultados de integridad de ARN obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa con hipoclorito de sodio y los obtenidos con el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent). Las muestras que cumplieron con los criterios de calidad establecidos por MACROGEN INC. lo hicieron en ambas técnicas. Esto sugiere que el método basado en hipoclorito es una alternativa económica y confiable para evaluar la integridad del ARN, y justifica su validación futura como método rutinario.

Los patrones de expresión diferencial de genes asociados a la biosíntesis de carotenoides y norisoprenoides fueron similares entre clones por cada estadio de desarrollo y concordantes con lo reportado por Da Silva et al. (2013).

El análisis de correlación de Pearson resultó ser una herramienta estadística rápida y útil para identificar relaciones entre genes y metabolitos. Permitió corroborar patrones esperados basados en la literatura sobre vías metabólicas, así como identificar nuevas correlaciones que abren posibilidades para estudios futuros sobre la biosíntesis de norisoprenoides. Sin embargo, al tratarse de un método no multivariable, no contempla interacciones no lineales, por lo que se propone como herramienta preliminar.

El gen *VIT\_08s0032g00800\_2*, codificante de CRTISO, mostró expresión diferencial entre clones, con mayor expresión en 717. Este gen presentó correlaciones positivas con la acumulación de carotenoides totales y, en particular, con  $\beta$ -caroteno, el conjunto de xantofilas (excluyendo luteína), violaxantina, neoxantina, luteoxantina y crisantemaxantina. Esto sugiere un rol potencialmente clave de CRTISO en la acumulación diferencial de carotenoides entre clones.

El gen CCD4 (*VIT\_02s0087g00930*) presentó un patrón de expresión que sugiere su participación tanto en el clivaje de carotenoides como en la formación de norisoprenoides. Se observaron correlaciones negativas con varios carotenoides y positivas con norisoprenoides específicos en ambos clones. Además, el gen *VIT\_13s0064g00810*, codificante de CCD1 mostró una correlación negativa con  $\beta$ -caroteno, lo que podría indicar su implicancia en la degradación de este compuesto.

Finalmente, no se observaron correlaciones entre los genes diferencialmente expresados que codifican CCD y la acumulación total de norisoprenoides. Esto podría explicarse debido a que muchos norisoprenoides no se originan directamente del clivaje de carotenoides mediado por CCD, sino que derivan de modificaciones fisicoquímicas o enzimáticas posteriores de los compuestos generados tras dicho clivaje.

Este trabajo permitió avanzar en la comprensión de los mecanismos moleculares y metabólicos involucrados en la síntesis de norisoprenoides en *Vitis vinifera* cv. Tannat, identificando genes clave, metabolitos relevantes y relaciones significativas entre ellos. Los resultados obtenidos sientan las bases para futuros estudios funcionales que profundicen en las vías biosintéticas implicadas y aporten al desarrollo de estrategias para potenciar el perfil aromático de esta variedad.

### **Perspectivas a futuro**

- Continuar el estudio de los genes que codifican para la enzima CRTISO y su implicancia en la acumulación de carotenoides.
- Estudiar en profundidad los carotenoides que presentaron correlación fuerte con los norisoprenoides con el objetivo de determinar nuevas posibles vías de formación de estos compuestos.
- Evaluar en los transcriptomas patrones de expresión de genes no identificados que puedan ser candidatos a participar en la biosíntesis de norisoprenoides.
- Investigar factores regulatorios de transcripción y traducción que puedan estar implicados en la expresión génica de los genes involucrados en las rutas biosintéticas de norisoprenoides.
- Ampliar el análisis a otras familias de compuestos volátiles o precursores aromáticos, para entender mejor el perfil aromático global del Tannat.
- Evaluar el efecto de un contenido residual de carotenoides en el aroma del vino.
- Replicar estos estudios en distintas regiones para evaluar la incidencia de condiciones ambientales diferentes en estos genes y sus precursores aromáticos.

## 8. Bibliografía

Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169.

Andrews, S. (n.d.). *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data*. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Baldivia, G. (2022). Desarrollo de técnica rápida para estimar el contenido de precursores aromáticos en uvas de la variedad Tannat. Informe de Pasantía para obtener el título de Ingeniero Químico de Facultad de Ingeniería UdelaR.

Bertola, B., Crovetto, A., Secco, Y., Bertola, L., & Bentancor, L. (2022). *Estadística de viñedos: Datos nacionales*. Departamento de Registro de Viñedos, Instituto Nacional de Viticultura (INAVI).

<https://www.inavi.com.uy/uploads/vinedo/e114169ff8dd5bd2a83547b5a8c60636eb4aebcc.pdf>

Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G., & Dellacassa, E. (2003). Aroma composition of *Vitis vinifera* cv. Tannat: The typical red wine from Uruguay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5408–5413.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Bong, D., Sohn, J., & Lee, S. J. V. (2024). Brief guide to RT-qPCR. *Molecules and Cells*, 47(12), 100141.

Boratyn, G. M., Camacho, C., Cooper, P. S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., Madden, T. L., Matten, W. T., McGinnis, S. D., & Merezuk, Y. (2013). BLAST: A more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W29–W33.

Carrau, F. M. (1997). The emergence of a new Uruguayan wine industry. *Journal of Wine Research*, 8(3), 179–185.

Cloonan, N., & Grimmond, S. M. (2008). Transcriptome analysis: Moving from microarrays to next-generation sequencing. *Genome Biology*, 9(234).

Coombe, B. G. (1992). Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 101–110.

Coombe, B. G., & McCarthy, M. G. (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 131–135.

- Crupi, P., Milella, R. A., & Antonacci, D. (2010). Simultaneous HPLC-DAD-MS (ESI+) determination of structural and geometrical isomers of carotenoids in mature grapes. *Journal of Mass Spectrometry*, 45(9), 971–980.
- De Frutos, E., & Beretta, A. (1999). *Un siglo de tradición: Primera historia de uvas y vinos del Uruguay*. Montevideo: Ediciones Santillana.
- Disegna, E., Coniberti, A., & Ferrari, V. (2014). *Revista del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)*, 109, 1–6.
- Disegna, E., Ferrari, V., & Coniberti, A. (2017). Estudio comparativo de clones comerciales de Tannat (*Vitis vinifera* L.) en el sur del Uruguay. *Agrociencia (Uruguay)*, 21(1), 33–42.
- Dockrall, S. (2012). *Carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs) of grape* [Master's thesis, Stellenbosch University]. SUNScholar. <https://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/71899>
- Dong, Z., & Chen, Y. (2013). Transcriptomics: Advances and approaches. *Science China Life Sciences*, 56(10), 960–967.
- Dyer, S. C., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., ... & Yates, A. D. (2025). Ensembl 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D948–D957. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1071>
- Fariña, L. (2008). *Tesis para la obtención de Doctor en Química*. Universidad de la República.
- Fariña, L., Carrau, F., Boido, E., Disegna, E., & Dellacassa, E. (2010). Carotenoid profile evolution in *Vitis vinifera* cv. Tannat grapes during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(4), 451–456.
- Fariña, L., Villar, V., Áres, G., Carrau, F., Dellacassa, E., & Boido, E. (2015). Volatile composition of Tannat red wines and their relation to sensory attributes. *Food Research International*, 69, 244–255.
- Fariña, L., Medina, K., Martín, V., Carrau, F., Dellacassa, E., & Boido, E. (2021). Tannat wine: Characteristics and key stages in its production. In *Fermented and Distilled Alcoholic Beverages: A Technological, Chemical and Sensory Overview. Red Wines* (pp. 163–196). Elsevier.
- Freitas, V., Ramalho, P., Azevedo, Z., & Macedo, A. J. (1999). Polyphenolic interactions in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4327–4331.
- Garde-Cerdán, T., Gutiérrez-Gamboa, G., Baroja, E., Rubio-Bretón, P., & Pérez-Álvarez, E. P. (2018). Influence of methyl jasmonate foliar application to vineyard on grape volatile composition over three consecutive vintages. *Food Research International*, 112, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.048>
- Guedes de Pinho, P., Martins, R. C., Vivier, M. A., Young, P. R., Oliveira, C. M., & Silva Ferreira, A. C. (2013). Terpenoid metabolism in grapes. In *ACS Symposium Series* (Vol. 1131, pp. 139–154). American Chemical Society.

Harshitha, R., & Arunraj, D. R. (2021). Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(5), 800–812.

Harris, J. M., Kriedemann, P. E., & Possingham, J. V. (1968). Anatomical aspects of grape berry development. *Vitis*, 7, 106–119.

Janusz, A., Capone, D. L., Puglisi, C. J., Perkins, M. V., Elsey, G. M., & Sefton, M. A. (2003). Identification of aroma-active compounds in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7759–7763.

Kassambara, A. (2023). *ggpubr: 'ggplot2' based publication ready plots* (Version 0.6.0) [R package]. <https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>

Kolberg, L., Raudvere, U., Kuzmin, I., Vilo, J., & Peterson, H. (2020). gprofiler2: An R package for gene list functional enrichment analysis and namespace conversion toolset g:Profiler. *F1000Research*, 9(ELIXIR), 709.

Lashbrooke, J. G., Young, P. R., Dockrall, S. J., Vasanth, K., & Vivier, M. A. (2013). Functional characterisation of three members of the *Vv* carotenoid cleavage dioxygenase gene family. *BMC Plant Biology*, 13, 156.

Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658–1659.

Lister, R., O'Malley, R. C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B. D., Berry, C. C., Millar, A. H., & Ecker, J. R. (2008). Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. *Cell*, 133(3), 523–536.

Malacarne, G., Lagreze, J., Rojas San Martin, B., Malnoy, M., Moretto, M., Moser, C., & Dalla Costa, L. (2024). Insights into the cell-wall dynamics in grapevine berries during ripening and in response to biotic and abiotic stresses. *Plant Molecular Biology*, 114(3). <https://doi.org/10.1007/s11103-024-01437-w>

Martin, D. M., & Bohlmann, J. (2004). Identification of *Vitis vinifera* alpha-terpineol synthase by in silico screening of full-length cDNA ESTs and functional characterization. *Phytochemistry*, 65(9), 1223–1229.

Mathieu S, Terrier N, Procureur J, Bigey F, Günata Z. A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. *J Exp Bot*. 2005;56:2721–2731. doi: 10.1093/jxb/eri265

Meng, N., Wei, Y., Gao, Y., Yu, K., Cheng, J., Li, X. Y., Duan, C. Q., & Pan, Q. H. (2020). Characterization of transcriptional expression and regulation of carotenoid cleavage dioxygenase 4b in grapes. *Frontiers in Plant Science*, 11, 483. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00483>

- Mendes-Pinto, M. M., Silva Ferreira, A. C., Caris-Veyrat, C., & Guedes de Pinho, P. (2005). Carotenoid, chlorophyll, and derived compounds in grapes and Port wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(25), 10034–10041.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5(7), 621–628.
- Mutz, K. O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J. G., & Stahl, F. (2013). Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(1), 22–30.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., & Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*, 320(5881), 1344–1349.
- Nieto, N. & Da Silva, Cecilia & Coniberti, A. & Boido, Eduardo & Carrau, Francisco & Dellacassa, Eduardo & Fariña, Laura. (2023). Estudio de precursores aromáticos en clones comerciales de Tannat y seguimiento de su evolución durante la maduración. BIO Web of Conferences. 68. 10.1051/bioconf/20236801045.
- Perestrelo, R., Barros, A. S., Rocha, S. M., & Câmara, J. S. (2011). Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of *Vitis vinifera* L. grape varieties. *Talanta*, 85, 1483–1493.
- Razungles, A., Bayonove, C., Cordonnier, R., & Baumes, R. (1987). Composition des arômes de raisins. *Vitis*, 26, 183–191.
- Razungles, A., Bayonove, C., Cordonnier, R., & Sapis, J. (1988). Etude des composés volatils des vins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 44–48.
- Razungles, A., Babic, I., Sapis, J., & Bayonove, C. (1996). Terpenic components in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Smit, S. J., Vivier, M. A., & Young, P. R. (2019). Linking terpene synthases to sesquiterpene metabolism in grapevine flowers. *Frontiers in Plant Science*, 10, 177. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00177>
- Timmins, J. J. B., Kroukamp, H., Paulsen, I. T., & Pretorius, I. S. (2020). The Sensory Significance of Apocarotenoids in Wine: Importance of Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 (CCD1) in the Production of  $\beta$ -Ionone. *Molecules*, 25(12), 2779.
- Vasconcelos, M. C., Greven, M., Winefield, C. S., Trought, M. C. T., & Raw, V. (2009). The flowering process of *Vitis vinifera*: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(4), 411. <https://doi.org/10.5344/ajev.2009.60.4.411>
- Wagner, E. M. (2013). Monitoring gene expression: Quantitative real-time RT-PCR. In *Lipoproteins and Cardiovascular Disease: Methods and Protocols* (pp. 19–45).

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag.  
<https://ggplot2.tidyverse.org>

Yu, D., Qiu, W., Zhang, Z., Glass, K., Su, J., DeMeo, D. L., Tantisira, K., & Weiss, S. T. (2019). New statistical methods for constructing robust differential correlation networks to characterize the interactions among microRNAs. *Scientific Reports*, 9, 15032.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40167-8>

## 9. Anexos

### Anexo 1.

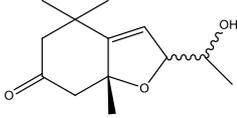
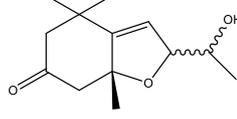
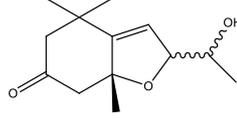
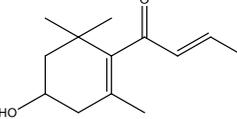
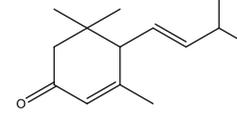
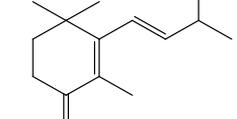
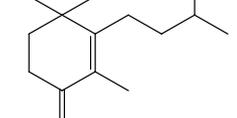
#### Anexo 1.a.

En la Tabla 16 se muestran los carotenoides identificados en este trabajo junto con sus tiempos de retención y longitudes de onda bibliográficas y experimentales.

<b>Tabla 16.</b> Tiempos de retención y longitudes de onda bibliográficas y experimentales para los carotenoides identificados en este trabajo.			
<b>Compuesto</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b><math>\lambda_{max}</math> (nm) Crupi et al. (2010)</b>	<b><math>\lambda_{max}</math> (nm) Experimental</b>
8R-Neocrome	26,05	400; 422; 450	400; 420; 450
SR-Neocrome	26,16	400; 422; 450	400; 420; 450
Neoxantina	26,37	414; 436; 464	418; 440; 462
Violaxantina	26,67	416; 439; 469	418; 442; 470
Carotenoide n.i. (no identificado)	27,14	400; 422; 444; 472	380; 400; 425; 475
8R Auroxantina	27,38	380; 402; 426	382; 402; 428
Luteoxantina	27,58	399; 422; 448	398; 420; 448
Flavoxantina	28,56	398; 422; 448	395; 420; 449
Crisantemaxantina	28,93	398; 422; 448	400; 422; 448
8S Auroxanthin	30,09	380; 402; 426	380; 400; 425
Luteina	33,09	422; 445; 426	422; 445; 426
Estructura tipo luteina	35,30	338; 422; 446; 468	336; 422; 440; 470
Zeaxantina	35,88	425; 450; 475	425; 450; 475
(9Z) o (9Z')-luteina (tr 36,12min)	36,12	330; 418; 440; 468	330; 420; 445; 470
(9Z) o (9Z')-lutein (tr 36,93 min)	36,93	330; 418; 440; 468	330; 420; 445; 470
b-Apo-8'-carotenal (SI)	41,16	460	460
$\beta$ -caroteno	58,39	428; 452; 478	428; 452; 478

## Anexo 1.b.

Las Tablas 17 y 18 muestran la fórmula, peso molecular, diagrama de molécula e índice de retención de Kovács para los norisoprenoides glicosilados y libres respectivamente.

IK	Nombre	Fórmula	Peso Molecular	Molécula
2404	3,4 dihidro-3-oxoactinidol I	$C_{13}H_{20}O_3$	224,3	
2420	3,4 dihidro-3-oxoactinidol II	$C_{13}H_{20}O_3$	224,3	
2485	3,4 dihidro-3-oxoactinidol III	$C_{13}H_{20}O_3$	224,3	
2500	3-hydroxi-β-damascona	$C_{13}H_{20}O_2$	208,3	
2591	3-oxo-α-ionol	$C_{13}H_{20}O_2$	208,3	
2598	4-oxo-β-ionol	$C_{13}H_{20}O_2$	208,3	
2637	4-oxo-7,8-dihidro-β-ionol	$C_{13}H_{22}O_2$	210,3	

2667	3-oxo-7,8-dihidro- $\alpha$ -ionol	$C_{13}H_{22}O_2$	210,3	
3112	Vomifoliol	$C_{13}H_{20}O_3$	224,3	
3166	7,8-dihidrovomifoliol	$C_{13}H_{22}O_3$	226,3	

**Tabla 18.** Norisoprenoides libres, junto con su fórmula, peso molecular, diagrama de la molécula e índice de retención de Kovács. Estructuras tomadas de Baldivia et al 2022

IK	Nombre	Fórmula	Peso Molecular	Molécula
1440	Teaspirano	$C_{13}H_{22}O$	194,3	
1458	Vitispirano I	$C_{13}H_{20}O$	192,3	
1463	Vitispirano II	$C_{13}H_{20}O$	192,3	
1773	Z- $\beta$ -damascenona	$C_{13}H_{18}O$	190,3	
1883	$\beta$ -ionona	$C_{13}H_{20}O$	192,3	

## Anexo 2.

### Anexo 2.a.

Rendimientos de las extracciones y mediciones de absorbancia tomadas mediante el equipo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) para cada muestra (Tabla 19).

Las muestras se identificaron de la siguiente manera:

Clon – Número de extracción – Muestreo (primer muestreo: G, segundo muestreo: EV, segundo muestreo: ER, tercer muestreo: M).

Las extracciones etiquetadas con “1e” que refieren a la primera elusión realizada en la extracción del ARN, mientras que las 2e, hacen referencia a la segunda elusión.

<b>Tabla 19.</b> Cantidad de cáscara de uva procesados por cada muestra y sus rendimientos de extracción en cantidad de ARN y sus relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230.						
<b>ID de Muestra</b>	<b>Muestra procesada</b>	<b>Cantidad de tejido (gramos)</b>	<b>ng/ul de ARN</b>	<b>ug de ARN totales</b>	<b>Absorbancia 260/280</b>	<b>Absorbancia 260/230</b>
717-1 G 1e	G_V_717-2	0.20	138.95	6.81	2.10	1.97
717-1 G 2e	G_V_717-2	0.20	24.37	1.19	1.99	1.04
717-2 G 1e	G_V_717-2	0.18	169.27	8.29	2.12	2.19
717-2 G 2e	G_V_717-2	0.18	21.84	1.07	2.07	1.44
717-3 G 1e	G_V_717-2	0.22	133.11	6.52	2.12	2.16
717-3 G 2e	G_V_717-2	0.22	20.95	1.03	2.00	1.57
717-4 G 1e	G_V_717-2	0.22	64.60	3.17	2.14	1.99
717-4 G 2e	G_V_717-2	0.22	15.81	0.77	1.55	0.82
717-5 G 1e	G_V_717-1	0.23	102.52	5.02	2.01	1.8
717-5 G 2e	G_V_717-1	0.23	26.57	1.30	1.78	1.18
717-6 G 1e	G_V_717-1	0.2	178.14	8.73	2.08	2.23
717-6 G 2e	G_V_717-1	0.2	66.72	3.27	1.99	2.18
717-7 G 1e	G_V_717-1	0.21	161.87	7.93	1.80	2.23
717-7 G 2e	G_V_717-1	0.22	48.57	2.38	2.03	1.58
717-8 G 1e	G_V_717-1	0.22	113.65	5.57	1.94	1.59
717-8 G 2e	G_V_717-1	0.22	21.72	1.06	1.83	1.03
474-1 G 1e	G_V_474-3	0.19	189.2	9.27	2.13	2.23
474-1 G 2e	G_V_474-3	0.19	40.43	1.98	1.94	1.53
474-2 G 1e	G_V_474-3	0.23	67.56	3.31	2.11	2.08
474-2 G 2e	G_V_474-3	0.23	18.90	0.93	2.05	1.52
474-3 G 1e	G_V_474-3	0.20	187.03	9.16	2.10	2.31
474-3 G 2e	G_V_474-3	0.20	41.01	2.01	1.72	1.23
474-4 G 1e	G_V_474-3	0.22	182.78	8.96	2.00	1.63
474-4 G 2e	G_V_474-3	0.22	33.93	1.66	2.04	1.74
474-5 G 1e	G_V_474-2	0.2	122.54	6.00	1.97	1.64
474-5 G 2e	G_V_474-2	0.2	26.04	1.28	1.73	1.29
474-6 G 1e	G_V_474-2	0.21	141.83	6.95	1.89	1.58
474-6 G 2e	G_V_474-2	0.21	34.89	1.71	1.69	1.12
474-7 G 1e	G_V_474-2	0.21	169.10	8.29	2.07	2.27
474-7 G 2e	G_V_474-2	0.21	88.90	4.36	1.6	1.04
474-8 G 1e	G_V_474-2	0.22	95.29	4.67	2.09	2.06
474-8 G 2e	G_V_474-2	0.22	27.82	1.36	1.95	1.94
474-9 G 1e	G_V_474-2	0.22	179.2	8.78	1.81	1.32
474-9 G 2e	G_V_474-2	0.22	36.55	1.79	1.95	1.57
474-10 G 1e	G_V_474-3	0.2	44.11	2.16	1.91	1.36
474-10 G 2e	G_V_474-3	0.2	8.90	0.43	1.75	0.68
717-1EV 1e	M2_V_717-3	0.24	134.95	6.61	2.05	1.83
717-1EV 2e	M2_V_717-3	0.24	58.17	2.85	1.73	1.00

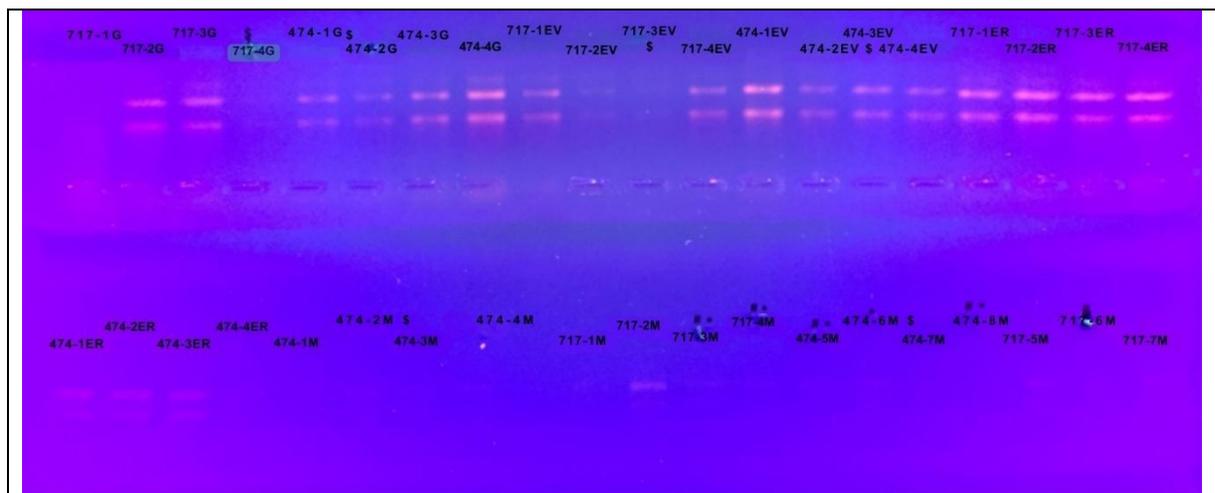
717-2EV 1e	M2_V_717-3	0.24	53.55	2.62	1.94	1.39
717-2EV 2e	M2_V_717-3	0.24	26.02	1.27	1.88	0.92
717-3EV 1e	M2_V_717-3	0.24	74.63	3.66	1.96	1.44
717-3EV 2e	M2_V_717-3	0.24	16.88	0.83	1.74	0.93
717-4EV 1e	M2_V_717-3	0.21	189.51	9.29	2.08	2.29
717-4EV 2e	M2_V_717-3	0.21	51.10	2.50	1.66	0.99
717-5EV 1e	M2_V_717-1	0.21	83.50	4.09	1.93	1.48
717-5EV 2e	M2_V_717-1	0.21	14.69	0.72	1.9	1.07
717-6EV 1e	M2_V_717-1	0.21	146.69	7.19	2.03	1.98
717-6EV 2e	M2_V_717-1	0.21	25.94	1.27	1.73	1.05
717-7EV 1e	M2_V_717-1	0.22	94.31	4.62	1.97	1.52
717-7EV 2e	M2_V_717-1	0.22	17.75	0.87	1.71	1.52
717-8EV 1e	M2_V_717-1	0.22	156.81	7.68	1.84	1.4
717-8EV 2e	M2_V_717-1	0.22	55.88	2.74	1.61	1.03
717-9EV 1e	M2_V_717-1	0.22	124.28	6.09	2.08	1.94
717-9EV 2e	M2_V_717-1	0.22	47.8	2.34	1.72	1.23
717-10EV 1e	M2_V_717-3	0.21	102.39	5.02	1.88	1.26
717-10EV 2e	M2_V_717-3	0.21	50.52	2.48	1.67	0.86
717-11EV 1e	M2_V_717-3	0.21	102.80	5.04	2.10	2.01
717-11EV 2e	M2_V_717-3	0.21	18.03	0.88	2.12	1.40
717-12EV 1e	M2_V_717-3	0.17	104.21	5.11	2.08	2.00
717-12EV 2e	M2_V_717-3	0.17	38.66	1.89	1.78	1.09
717-13EV 1e	M2_V_717-3	0.18	143.83	7.05	2.03	1.80
717-13EV 2e	M2_V_717-3	0.18	29.35	1.43	1.7	0.98
474-1EV 1e	M2_V_474-1	0.18	209.95	10.29	2.08	2.17
474-1EV 2e	M2_V_474-1	0.18	39.81	1.95	1.94	1.55
474-2EV 1e	M2_V_474-1	0.19	207.23	10.15	1.58	0.72
474-2EV 2e	M2_V_474-1	0.19	23.9	1.17	1.5	0.61
474-3EV 1e	M2_V_474-1	0.19	146.44	7.18	2.05	2.24
474-3EV 2e	M2_V_474-1	0.19	16.56	0.81	1.77	1.68
474-4EV 1e	M2_V_474-1	0.20	128.43	6.29	2.07	2.22
474-4EV 2e	M2_V_474-1	0.20	34.12	1.67	1.58	1.06
474-5EV 1e	M2_V_474-3	0.19	131.98	6.47	2.02	2.02
474-5EV 2e	M2_V_474-3	0.19	16.84	0.83	1.84	1.54
474-6EV 1e	M2_V_474-3	0.22	115.08	5.64	2.07	2.09
474-6EV 2e	M2_V_474-3	0.22	28.74	1.41	1.64	0.96
474-5ER 1e	M2_R_474-2	0.22	173.04	8.48	2.1	2.3
474-5ER 2e	M2_R_474-2	0.22	24.29	1.19	1.74	1.51
474-6ER 1e	M2_R_474-2	0.22	151.82	7.44	2.1	2.31
474-6ER 2e	M2_R_474-2	0.22	33.05	1.61945	2.03	1.85
474-7EV 1e	M2_V_474-3	0.21	104.90	5.14	1.77	1.11
474-7EV 2e	M2_V_474-3	0.21	36.07	1.77	1.63	0.95
474-8EV 1e	M2_V_474-3	0.23	63.69	6.31	2.00	1.78
474-8EV 2e	M2_V_474-3	0.23	59.17	2.90	1.50	0.80
474-9EV 1e	M2_V_474-3	0.21	65.47	3.21	1.91	1.47
474-9EV 2e	M2_V_474-3	0.21	34.17	1.67433	2.21	0.8
474-10EV 1e	M2_V_474-3	0.2	123.35	6.04	2.04	1.87
474-10EV 2e	M2_V_474-3	0.2	22.35	1.10	1.92	1.15
474-11EV 1e	M2_V_474-3	0.2	146.11	7.16	1.89	1.42
474-11EV 2e	M2_V_474-3	0.2	15.11	0.74039	1.82	1.11
717-1ER 1e	M2_R_717-2	0.21	215.52	10.56	2.11	2.27
717-1ER 2e	M2_R_717-2	0.21	60.17	2.95	1.99	1.72
717-2ER 1e	M2_R_717-2	0.20	179.17	8.78	2.13	2.34
717-2ER 2e	M2_R_717-2	0.20	38.57	1.89	2.17	2.24
717-3ER 1e	M2_R_717-2	0.20	187.61	9.19	2.15	2.32
717-3ER 2e	M2_R_717-2	0.20	28.54	1.40	1.98	2.06
717-4ER 1e	M2_R_717-2	0.23	185.23	9.08	2.13	2.27
717-4ER 2e	M2_R_717-2	0.23	45.25	2.22	1.99	2.29
717-5ER 1E	M2_R_717-2	0.2	98.09	4.81	2.13	1.83
717-5ER 2E	M2_R_717-2	0.2	13.43	0.66	1.69	1.02
717-6ER 1E	M2_R_717-2	0.19	98.8	4.84	2.26	2.11
717-6ER 2E	M2_R_717-2	0.19	35.3	1.73	1.62	1.07

717-7ER 1E	M2_R_717-2	0.18	95.78	4.69	2.1	1.9
717-7ER 2E	M2_R_717-2	0.18	23.23	1.14	1.74	0.91
717-8ER 1E	M2_R_717-2	0.17	111.17	5.45	1.88	1.31
717-8ER 2E	M2_R_717-2	0.17	36.05	1.77	1.57	0.83
717-9ER 1E	M2_R_717-2	0.18	137.61	6.74	2.09	1.89
717-9ER 2E	M2_R_717-2	0.18	36.63	1.79	1.84	1.05
717-10ER 1E	M2_R_717-2	0.15	94.86	4.65	1.97	1.6
717-10ER 2E	M2_R_717-2	0.15	18.97	0.93	2.21	1.34
717-11ER 1E	M2_R_717-2	0.13	142.21	6.97	2.02	1.68
717-11ER 2E	M2_R_717-2	0.13	40.6	1.99	1.78	1.28
717-12ER 1E	M2_R_717-2	0.22	77.74	3.81	2.05	1.96
717-12ER 2E	M2_R_717-2	0.22	12.95	0.63	2.45	1.71
717-13ER 1E	M2_R717-3	0.2	139.06	6.81	2.14	2.24
717-13ER 2E	M2_R717-3	0.2	111.35	5.46	2.2	2.23
717-13ER 2E	M2_R717-3	0.2	53.82	2.64	1.56	0.89
717-14ER 1E	M2_R717-3	0.22	139.41	6.83	2.11	2.01
717-14ER 2E	M2_R717-3	0.22	58.08	2.85	1.58	0.86
717-15ER 1E	M2_R717-3	0.2	111.64	5.47	2.13	2.11
717-15ER 2E	M2_R717-3	0.23	14.85	0.73	1.95	1.74
717-16ER 1E	M2_R717-3	0.25	111.64	5.47	2.13	2.03
717-16ER 2E	M2_R717-3	0.25	48.27	2.37	1.6	0.88
474-1ER 1e	M2_R_474-1	0.23	182.60	8.95	2.09	2.15
474-1ER 2e	M2_R_474-1	0.23	39.54	1.94	1.86	1.40
474-2ER 1e	M2_R_474-1	0.20	130.43	6.39	2.13	2.18
474-2ER 2e	M2_R_474-1	0.20	51.44	2.52	1.76	1.12
474-3ER 1e	M2_R_474-1	0.28	135.77	6.65	2.11	2.28
474-3ER 2e	M2_R_474-1	0.28	25.84	1.27	1.71	1.41
474-4ER 1e	M2_R_474-1	0.21	112.50	5.51	2.12	2.28
474-4ER 2e	M2_R_474-1	0.21	23.28	1.14	1.47	0.97
474-1 M 1e	M_R_474-2	0.2	83.72	4.10	2.03	1.89
474-1 M 2e	M_R_474-2	0.2	30.82	1.51	1.59	0.81
474-2 M 1e	M_R_474-2	0.19	93.02	4.56	2.11	1.98
474-2 M 2e	M_R_474-2	0.19	24.25	1.19	1.69	1.09
474-3 M 1e	M_R_474-2	0.21	95.22	4.67	2.06	2.05
474-3 M 2e	M_R_474-2	0.21	17.30	0.85	1.73	0.99
474-4 M 1e	M_R_474-2	0.2	86.81	4.25	2.03	1.99
474-4 M 2e	M_R_474-2	0.2	29.28	1.43	1.59	0.86
717-1 M 1e	M_R_717-3	0.22	86.39	4.23	2.03	1.97
717-1 M 2e	M_R_717-3	0.22	41.26	2.02	1.67	0.97
717-2 M 1e	M_R_717-3	0.23	91.08	4.46	2.02	2.03
717-2 M 2e	M_R_717-3	0.23	28.32	1.39	1.92	1.57
717-3 M 1e	M_R_717-3	0.23	67.24	3.29	1.95	1.69
717-3 M 2e	M_R_717-3	0.23	21.61	1.06	1.79	1.51
717-4 M 1e	M_R_717-3	0.21	74.11	3.63	2.04	1.93
717-4 M 2e	M_R_717-3	0.21	22.38	1.10	1.74	1.25
474-5 M 1e	M_R_474-1	0.21	89.49	4.39	2.02	1.83
474-5 M 2e	M_R_474-1	0.21	24.67	1.21	1.49	0.89
474-6 M 1e	M_R_474-1	0.2	118.25	5.79	2.03	1.86
474-6 M 2e	M_R_474-1	0.2	24.17	1.18	1.58	0.99
474-7 M 1e	M_R_474-1	0.23	88.61	4.34	2.01	1.90
474-7 M 2e	M_R_474-1	0.23	13.73	0.67	1.62	1.05
474-8 M 1e	M_R_474-1	0.22	78.18	3.83	2.02	1.80
474-8 M 2e	M_R_474-1	0.22	25.50	1.25	1.31	0.78
717-5 M 1e	M_R_717-1	0.24	91.17	4.47	2.10	2.02
717-5 M 2e	M_R_717-1	0.24	27.41	1.34	1.85	1.14
717-6 M 1e	M_R_717-1	0.22	78.03	3.82	2.12	1.95
717-6 M 2e	M_R_717-1	0.22	16.19	0.79	2.04	1.28
717-7 M 1e	M_R_717-1	0.24	80.47	3.94	2.08	1.84
717-7 M 2e	M_R_717-1	0.24	36.29	1.78	1.61	1.02
717-8 M 1e	M_R_717-1	0.24	61.90	3.03	2.15	2.03
717-8 M 2e	M_R_717-1	0.24	9.20	0.45	1.78	1.36
717-9 M 1e	M_R_717	0.21	73.01	3.58	2.09	1.93

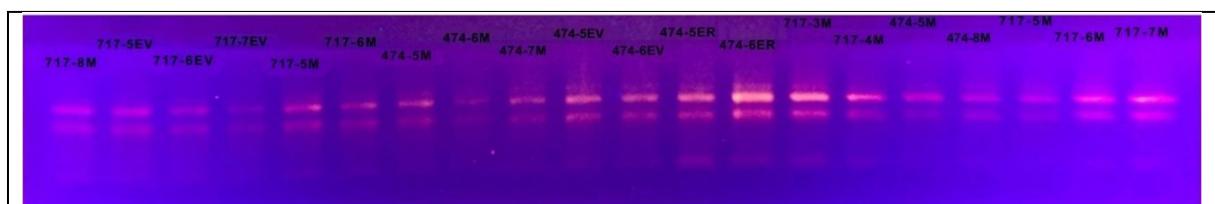
717-9 M 2e	M_R_717	0.21	15.51	0.76	1.92	1.6
717-10 M 1e	M_R_717	0.21	79.93	3.92	2.11	1.91
717-10 M 2e	M_R_717	0.21	17.53	0.86	2.07	1.56

## Anexo 2.b.

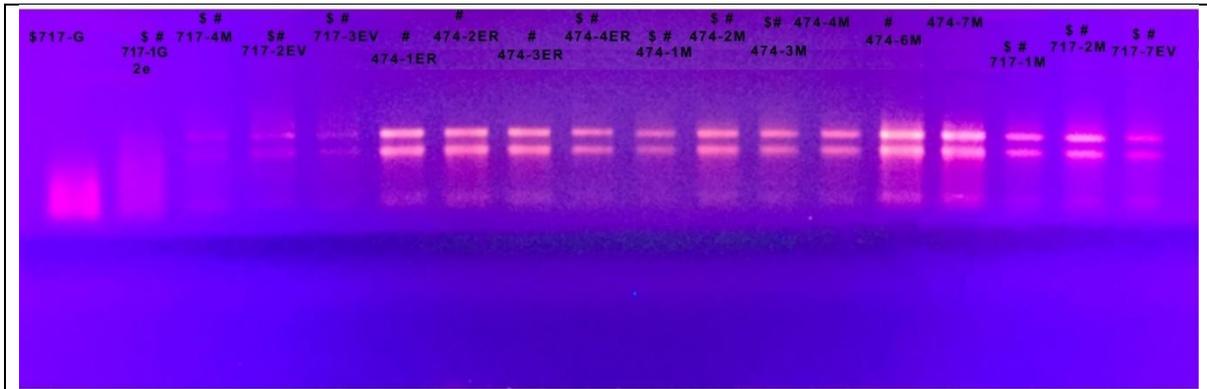
En las Figuras (26, 27, 28, 29, 30 y 31) se observan las electroforesis de las extracciones de ARNs en gel de Agarosa 1% TAE 1X con 1,5 ml de Hipoclorito de sodio 4% y 3ul BrEt 10 ng/ul según Aranda et al. 2012.



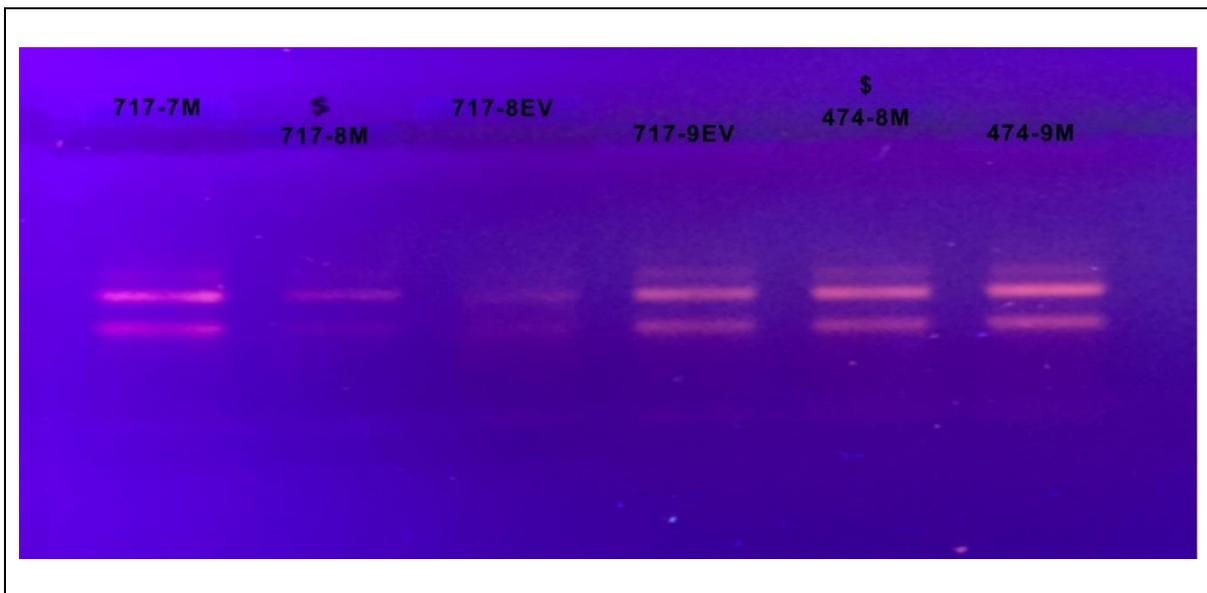
**Figura 26.** Electroforesis de ARNs. 2da Elución de muestras. Gel Agarosa 1% TAE 1X, 1,5 ml de Hipoclorito de sodio 4%, 3ul BrEt 10ng/ul. Gel de 100 ml. Se cargaron 0.5 ug de ARN para todas las muestras con excepción en las marcadas: \$ (0.3 ug), & (0.2 ug). Las marcadas con “#” se corrieron nuevamente en el gel siguiente. Todas las muestras fueron 1e. Muestras cargadas: 717-1G, 717-3G, 474-1G, 717-2G, 717-4G, 474-3G, 474-2G, 717-1EV, 474-4G, 717-2EV, 717-3EV, 474-1EV, 717-4EV, 474-2ER, 474-4ER, 474-1ER, 474-3ER, 474-1M, 474-2M, 474-4M, 474-3M, 474-3EV, 474-2EV, 474-4EV, 717-1ER, 717-3ER, 717-2ER, 717-4ER, 717-2M, 717-4M, 474-6M, 474-8M, 717-6M, 717-1M, 717-3M, 474-5M, 474-7M, 717-5M y 717-7M.



**Figura 27.** Electroforesis número 2 de ARNs. Gel Agarosa 1% TAE 1X, 1,5 ml de Hipoclorito de sodio 4%, 3ul BrEt 10ng/ul. Gel de 100 ml. Se cargaron 0.5 ug de ARN para todas las muestras con excepción en las marcadas: \$ (0.3 ug), & (0.2 ug). Los últimos 7 fueron corridos en el gel anterior. Todas las muestras fueron 1e. Muestras sembradas: 717-5EV, 717-8M, 717-7EV, 717-6EV, 717-5M, 717-6M, 474-5M, 474-6M, 474-5EV, 474-7M, 474-5ER, 474-6ER, 474-6ER, 717-3M, 717-4M, 474-5M, 474-8M, 717-5M, 717-6M y 717-7M.



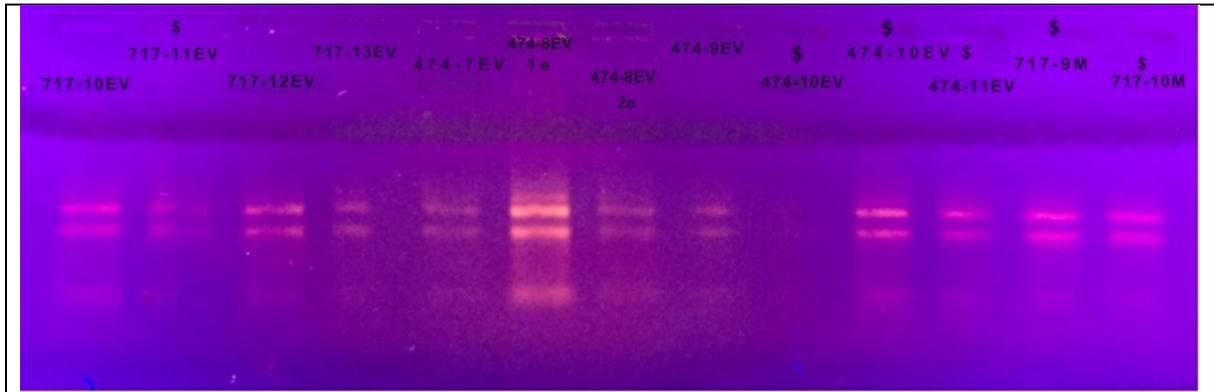
**Figura 28.** Electroforesis de ARNs . Gel Agarosa 1% TAE 1X, 1,5 ml de Hipoclorito de sodio 4%, 3ul BrEt 10ng/ul. Gel de 50 ml. Se cargaron 0.5 ug de ARN. Los marcados con "\$" corrieron otras cantidades. Las marcadas con "#" fueron corridas repetidas del gel anterior. Todas las muestras fueron 1e a excepción de la marcada como 2e. de Las muestras corridas fueron: 717-3EV, 474-2ER, 474-4ER, 474-2M, 474-3ER, 474-1M, 474-3M, 474-4M, 474-7M, 474-6M, 717-2M, 717-1M, 717-7EV, 717-G, 717-4M, 717-2EV, 717-1G 2e y 474-1ER.



**Figura 29.** Electroforesis de ARNs. Gel Agarosa 1% TAE 1X, 1,5 ml de Hipoclorito de sodio 4%, 3ul BrEt 10ng/ul. Gel de 50 ml. Se cargaron 0.5 ug de ARN. Los marcados con "\$" corrieron otras cantidades. Todas las muestras fueron 1e. Muestras sembradas: 717-7M, 717-8M, 717-8EV, 717-9EV, 474-8M y 474-9M.



**Figura 30.** Electroforesis de ARNs. Gel Agarosa 1% TAE 1X, 1,5 ml de Hipoclorito de sodio 4%, 3ul BrEt 10ng/ul. Gel de 50 ml. Se cargaron 0.5 ug de ARN. Los marcados con "\$" corrieron otras cantidades. Todas las muestras fueron 1e a excepción de la marcada como 2e. de Las muestras corridas fueron: 717-11EV, 717-10EV, 717-13EV, 717-12EV, 474-8EV, 474-7EV, 474-9EV, 474-10EV, 717-9M, 474-8EV 2e, 474-10EV, 474-11EV, 717-10M



**Figura 31.** Electroforesis de ARNs. Gel Agarosa 1% TAE 1X, 1,5 ml de Hipoclorito de sodio 4%, 3ul BrEt 10ng/ul. Gel de 50 ml. Se cargaron 0.5 ug de ARN. Todas las muestras fueron 1e. Las muestras corridas fueron: 717-5ER, 717-6ER, 717-7ER, 717-8ER, 717-9ER, 717-11ER, 717-10ER, 717-12ER

## Anexo 2.c.

En el siguiente enlace se encuentra el archivo con los análisis de expresión diferencial para cada condición evaluada en este trabajo junto con los transcriptomas normalizados por RLD y la Anotación G.O. de los genes.

[https://docs.google.com/spreadsheets/d/1p5gC-e2H0oJMSDAFXMgj\\_kRRL-tA7TFbZkvzL3H3A-Q/edit?usp=sharing](https://docs.google.com/spreadsheets/d/1p5gC-e2H0oJMSDAFXMgj_kRRL-tA7TFbZkvzL3H3A-Q/edit?usp=sharing)