



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL
TRANSCRIPCIONAL DE GENES DURANTE O
DESENVOLVIMENTO INICIAL DO FRUTO EM
VIDEIRA SEM SEMENTES (*Vitis vinifera* L. cv. 'Sultanina')**

Tese de Doutorado

Danielle Costenaro da Silva

Porto Alegre, Março de 2010

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL
TRANSCRICIONAL DE GENES DURANTE O
DESENVOLVIMENTO INICIAL DO FRUTO EM
VIDEIRA SEM SEMENTES (*Vitis vinifera* L. cv. ‘Sultanina’)**

Danielle Costenaro da Silva

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Co-orientadores: Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques

Dr. Luís Fernando Revers

Porto Alegre, Março de 2010

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho contou com a participação das Instituições abaixo:

- Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular – CBiot/UFRGS;
- Laboratório de Biologia Molecular Vegetal – CBiot/UFRGS;
- Centro de Biotecnologia, UFRGS;
- Laboratório de Biologia Molecular Vegetal – Embrapa Uva e Vinho.

Este trabalho foi possível pela concessão de Bolsa de Doutorado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação (MEC) e, igualmente importante, de apoios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Edital Universal) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa.

A meus pais, Sergio e Olimpia, por tudo
Aos meus queridos irmãos, Daniel e Daiane
Ao Felipe, meu amor

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente, ao meu orientador, Prof. Dr. Giancarlo Pasquali, pela confiança depositada, pelo conhecimento compartilhado e pelo exemplo de seriedade acadêmica e profissional.

Da mesma forma, agradeço ao meu co-orientador, Dr. Luís Fernando Revers, verdadeiro modelo de dedicação à pesquisa, que sempre esteve à disposição para me orientar de maneira plena, dedicando-se com tempo e com atenção inigualáveis.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques, que esteve permanentemente de portas abertas para ajudar no que fosse necessário, além de contribuir com valiosas críticas e sugestões.

A todos os demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial à Prof^a Dra. Márcia Margis e Prof^o Dr. Rogério Margis, expresso minha gratidão por fazerem desta longa empreitada um período de constante aprendizado.

Igualmente, manifesto os meus agradecimentos aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, os quais contribuíram para o melhor aproveitamento do período em que permaneci como acadêmico daquela Instituição.

Agradeço a todos meus amigos, os quais, de forma manifesta ou anônima, cooperaram para a realização desta pesquisa.

Por fim, agradeço a Deus, por colocar pessoas tão especiais no meu caminho.

Aconteceu aos verdadeiros sábios o que se verifica com as espigas de trigo, que se erguem orgulhosamente enquanto vazias e, quando se enchem e amadurece o grão, se inclinam e dobram humildemente. Assim esses homens, depois de tudo terem experimentado, sondado e nada haverem encontrado nesse amontoado considerável de coisas tão diversas, renunciaram à sua presunção e reconheceram a sua insignificância.

[...] Quando perguntaram ao homem mais sábio que já existiu o que ele sabia, ele respondeu que a única coisa que sabia era que nada sabia. Sua resposta confirma o que se diz, ou seja, que a mais vasta parcela do que sabemos é menor que a mais diminuta parcela do que ignoramos. Em outras palavras, aquilo que pensamos saber é parte – e parte ínfima – da nossa ignorância.

MONTAIGNE (1592)

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABA - Ácido abscísico (*abscisic acid*)
- ACC - Ácido 1-aminociclopropanocarboxílico (*1-Aminocyclopropanecarboxylic acid*)
- AIA - Ácido indol-3-acético (*Indole-3-acetic acid*)
- ACT - Actina (*Actin*)
- AFLP - Polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)
- BAC - Cromossomo Artificial de Bactéria (*Bacterial Artificial Chromosom*)
- BBCH - *Basf, Bayer, Ciba-Geigy e Hoechst*
- BR - Brassinosteróides (*brassinosteroids*)
- BRAT - Análise representacional de transcritos em Bulk (*Bulk Representational Analysis of Transcripts*)
- BRIX - Método/unidade de medida da concentração de açúcares
- cDNA - DNA complementar (*complementary DNA*)
- cDNA-AFLP - polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado de *cDNA* (*cDNA amplified fragment length polymorphism*)
- cv - Cultivar
- DD - Amostragem diferencial (*Differential Display*)
- DDD - Amostragem diferencial digital (*Differential Digital Display*)
- DD-PCR - Amostragem diferencial da Reação em Cadeia da Polimerase (*Digital Display-Polimerase chain reaction*)
- DNA - Ácido deoxiribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
- Dof - *DNA binding domain with one finger*
- DP - Produto diferencial (*Differential product*)
- DS - Estádio de desenvolvimento (*Developmental stages*)
- DS0 - Estabelecimento dos frutos (*Fruit Set*)
- EREBP - Elemento de ligação a proteína responsivo ao etileno (*ethylene-responsive element-binding protein*)
- ERF - Fatores responsivo ao etileno (*ethylene responsive factors*)
- EST- Etiqueta de sequência expressa (*expressed sequence tag*)
- FAO - *Food and Agriculture Organization*
- flb - Fruto sem polpa (*fleshless Berry*)

GA - Acido Giberélico (*Giberelic acid*)
GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)
GFX - *PCR DNA and Gel Band Purification Kit*
ha - Hectare
LG - Grupo de ligação (*Linkage group*)
MCOGS - Grandes agrupamentos de ortólogos (*Major cluster orthologous groups*)
MIPS - *Munich Information Center for Protein Sequences*
M-MLV - *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*
mRNA - RNA mensageiro (*Messenger RNA*)
NCBI - Centro Nacional para Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)
PCR - Reação da polimerase em cadeia (*Polimerase Chain Reaction*)
QTL - *Locus* de característica quantitativa (*Quantitative Trait Loci*)
qPCR - Reação da cadeia da polimerase quantitativa (*Quantitative Polimerase Chain Reaction*)
RDA - Análise representacional diferencial (*Representational Differential Analysis*)
RGA - Análogos de genes de resistência (*Resistance Gene Analogues*)
RNA - Ácido ribonucléico (*Ribonucleic Acid*)
RNase - Ribonuclease
rRNA - RNA Ribossomal
RT-qPCR - PCR quantitativa em tempo real precedida de transcrição reversa
SAGE - *Serial Analysis of Gene Expression*
SCAR - *Sequence Characterized Amplified Region*
SdI - Inibidor do desenvolvimento da semente (*Seed development Inhibitor*)
SEPLAG - Secretaria de Planejamento e Gestão
SISGEN - *Automatized system of Sequence Analysis*
SNP - *Single-nucleotide polymorphism*
SSR - *Simple Sequence Repeats*
t - Toneladas
TIGR - *The Institute for Genomic Research*
TDF - *Transcript-derived fragments*

TUB - Tubulina (*Tubulin*)

VIGS - Silenciamento de gene induzido por vírus (*Virus-induced Gene Silencing*)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferenças morfológicas entre subespécies de videiras cultivadas (subespécie *vinifera*) e selvagens (subespécie *silvestris*). São mostradas a diferença na folha, flor (macho e fêmea para *silvestris*), o cacho na maturidade e as sementes.....**25**
- Figura 2.** Estrutura de um fruto de uva maduro seccionado parcialmente ao longo eixo central, permitindo visualizar, as partes internas.....**32**
- Figura 3.** Representação dos principais estádios e fenômenos fisiológicos do desenvolvimento dos frutos da videira. Na figura, podem-se observar as mudanças de tamanho e cor de bagas com intervalos de 10 dias desde o florescimento, passando pelos maiores eventos de desenvolvimento (caixas em cor verde). São também mostrados os períodos de acúmulo de compostos, os níveis “brix” e a indicação da taxa de influxo de sucros vasculares derivados do xilema e floema para os frutos.....**33**
- Figura 4.** Cultivares de uva sem sementes desenvolvidas na Embrapa Uva & Vinho (Bento Gonçalves, RS) e variação da expressão fenotípica da estenoespermocarpia na videira. (A) BRS Morena, BRS Clara e BRS Linda e detalhe do fruto. (B) Variação da expressão da estenoespermocarpia observada na videira com a definição da aparência das sementes. Fonte: acervo da Embrapa Uva e Vinho.....**34**
- Figura 5.** Seção longitudinal de um traço de semente de uva mostrando a degeneração do endosperma. Na fotografia está salientado o embrião e a cavidade resultante da degeneração prematura do endosperma.....**40**
- Figura 6.** Estratégia de subtração de BRAT. B1, B2 e B3: bibliotecas 1, 2 e 3 respectivamente. DPN1 e DPN2 significam primeiro produto diferencial e segundo produto diferencial, respectivamente.....**163**
- Figura 7.** Expressão relativa de VvUBP1(A), VvRIP1(B), VvP450(C), VvDOF(D), VvCLP1(E) e VvGID1L1(F) medidas por PCR quantitativo em tempo real nos diferentes estádios de desenvolvimento durante a safra de 2005/2006 e 2007/2008. Estádios de desenvolvimento (DS) são representados no eixo X e a expressão relativa ao estágio DS0 no eixo Y. As expressões dos genes de referências VvACT e VvTUB (G) foram utilizadas para normalizar os valores de expressão dos genes candidatos.....**164**
- Figura 8.** Expressão relativa de VvUPP1(A) e VvFBA1(B) medidas por PCR quantitativo em tempo real nos diferentes estádios de desenvolvimento durante a safra de 2004/2005. Estádios de desenvolvimento (DS) são representados no eixo X e a expressão relativa ao estágio DS0 no eixo Y. As expressões dos genes de referências VvACT e VvTUB (D) foram utilizadas para normalizar os valores de expressão dos genes candidatos. As barras marcadas por retângulos representam os estádios dos quais os genes candidatos foram isolados da estratégia BRAT.....**168**

LISTA DE TABELAS

Tabela I. As diferentes hipóteses propostas para explicar a herança da apirenia em videira.....	41
Tabela II. Quadro final de clones sequenciados por biblioteca.....	160
Tabela III. Quadro demonstrativo de distribuição de TDFs nas diferentes bibliotecas obtidas após análise bioinformática.....	160
Tabela IV. Genes selecionados potencialmente envolvidos na regulação do desenvolvimento inicial da cv. de uva Sultanina através da estratégia BRAT.....	161
Tabela V. Primers usados para análise de expressão qPCR por RDA.....	162

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
ÍNDICE.....	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	18
FORMATO E ORGANIZAÇÃO DA TESE.....	21
CAPÍTULO I.....	22
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
1. O Gênero <i>Vitis</i>	23
1.1 A espécie <i>Vitis vinifera</i> L.....	24
2. Aspectos econômicos da Viticultura.....	26
3. Cultivares de uvas apirênicas.....	28
4. Desenvolvimento do fruto da videira.....	30
4.1 A regulação hormonal do desenvolvimento do fruto da videira.....	35
5. A apirenia no fruto da videira.....	39
6. A genômica da videira.....	42
7. O transcrito da videira.....	44
8. Referências bibliográficas.....	49
CAPÍTULO II.....	57
Manuscrito submetido à revista <i>Plant Cell Reports</i>	58
CAPÍTULO III.....	90
Manuscrito submetido à revista <i>Plant Physiology</i>	91
CAPÍTULO IV.....	132
DISCUSSÃO GERAL.....	133
1. Genes de videira sem sementes com expressão específica ao estágio de estabelecimento do fruto (DS0).....	134
2. Genes de videira sem sementes com expressão específica de quatro semanas após o estágio DS0.....	137
3. Genes de videira sem sementes com expressão específica de oito semanas após o estágio DS0.....	140

4. Padrão de expressão entre safras.....	143
5. Análise molecular e filogenética da família de proteínas Dof em videira.....	145
6. Conclusões e Perspectivas.....	149
7. Referências bibliográficas.....	151
ANEXOS.....	159
Anexo I.....	160
Anexo II.....	163
CURRICULUM VITAE RESUMIDO.....	182

RESUMO

A obtenção de novas cultivares de uvas de mesa e a compreensão da regulação da expressão gênica, associada à formação do fruto de uma cultivar de uva sem semente, constituem pré-requisitos essenciais para o desenvolvimento de ferramentas aplicadas ao melhoramento genético para essas espécies. Com este objetivo, dois trabalhos foram conduzidos a partir do estudo de transcritos derivados de frutos da cultivar (cv) Sultanina de videira. No primeiro trabalho, três bibliotecas subtraídas foram construídas a partir de RNA total de frutos em diferentes estádios de formação, utilizando-se uma metodologia modificada da análise representacional diferencial (RDA), denominada análise representacional de transcritos em grupos (BRAT). Um total de 2.500 fragmentos derivados de transcritos (TDFs) foram identificados e clonados a partir de estádios específicos do desenvolvimento do fruto. Após sequenciamento e análise *in silico*, 1.554 (62,16%) dos transcritos foram validados de acordo com a qualidade da sequência. A montagem das sequências derivadas de genes expressos (ESTs) resultou em 726 singletos e 69 clusters, com aproximadamente 76% de redundância. Entre os TDFs identificados, onze genes candidatos e dois genes-referência foram selecionados e submetidos a uma análise aprofundada dos seus perfis de expressão temporal por RT-qPCR. A expressão de sete genes foi concordante com os estádios específicos do desenvolvimento dos frutos. Entre os candidatos selecionados os genes a seguir listados são possivelmente os mais promissores quando se considera o desenvolvimento do fruto da cv. Sultanina: (i) VvUBP1 (proteína de ligação a oligouridilatos), (ii) VvRIP1 (proteínas induzidas pelo amadurecimento), (iii) VvP450 (citocromo P₄₅₀), (iv) VvDOF1 (proteína do tipo Dof); (v) VvERF1 (fator de transcrição responsivo ao etileno), e (vi) VvGID1L1 (receptor de ácido giberélico). Num segundo momento, foi realizado um estudo mais detalhado dos genes *Dof* de videira. Tais genes correspondem a um grupo de fatores de transcrição específicos de plantas, os quais estão envolvidos na regulação de diferentes funções, tais como, resposta ao estresse, hormônios e luz, sinalização de fitocromo, germinação de sementes e expressão gênica tecido-específica. A família de genes *Dof* de videira compreende 26 membros, sendo que as sequências de aminoácidos de todos os domínios *Dof* alinham perfeitamente, incluindo resíduos de cisteína que são críticos para a ligação de zinco e outros resíduos conservados em fatores de transcrição Dof de *A. thaliana*, *O. sativa* e outras plantas. Baseado na análise de domínios Dof, sugere-se que estes domínios sejam possivelmente

funcionais em videira. A localização física dos genes *Dof* nos cromossomos de videira foi realizada. Além disso, foi conduzida uma análise filogenética comparando o grupo de genes *Dof* em videira com os seus homólogos em outras duas eudicotiledôneas completamente sequenciadas, *A. thaliana* e *Populus*, permitindo identificar claramente clusters de genes parálogos e ortólogos. Por fim, os perfis de expressão de todos os 26 genes *Dof* foram estudados por RT-qPCR em nove órgãos de videira.

ABSTRACT

Table grapes production and knowledge about the gene expression regulation associated with the formation of seedless grape cultivar, constitute essential prerequisites for the development of tools applied to genetic improvement of this plant species. To this end, two studies were conducted using the analysis of transcripts derived from fruits of the Sultanina cultivar (cv.) grapevine. In the first study, three subtracted libraries were constructed from total RNA from fruit different developmental stages using a modified methodology of Representational Difference Analysis (RDA), named Bulk Representational Analysis of Transcripts (BRAT). A total of 2,500 transcripts-derived fragments (TDFs) were identified and cloned from specific stages of fruit development. After sequencing and analysis *in silico*, 1,554 (62.16%) transcripts were validated in accordance with the sequence quality. The assembly of sequences derived from expressed genes (ESTs) resulted in 726 singletons and 69 clusters, with overall EST redundancy of approximately 76%. Among the TDFs identified eleven candidate genes and two reference genes were selected and subjected to a thorough analysis of their temporal expression profiles by RT-qPCR. Among them, seven genes proved to be in agreement with the stage-specific expression. Among candidates selected from those differentially expressed, the genes listed below were considered the most promising when considering the fruit development in grapevine cv. Sultanina: (i) VvUBP1 (oligouridylate binding protein), (ii) VvRIP1 (ripening induced protein), (iii) VvP450 (cytochrome P450), (iv) VvDOF1 (Dof-like protein), (v) VvERF1 (ethylene-responsive transcription factor), and (vi) VvGID1L1 (gibberellins receptor). The second study detailed the grapevine *Dof* gene family. Dof proteins are involved in the regulation of different functions such as plant response to stress, hormones and light phytochrome signaling, seed germination and tissue-specific gene expression. The *Dof* gene grapevine family includes 26 members. The amino acid sequences deduced from Dof domains matched perfectly including cysteine residues critical for zinc binding and other residues known to be conserved in Dof transcription factors from *A. thaliana*, *O. sativa* and other plants. Based on analysis of Dof domains, it is suggested that all grapevine Dof domains are possibly functional. The physical location of *Dof* genes in grapevine chromosome was determined. A phylogenetic study comparing grapevine *Dof* genes with their counterparts in two other eudicots completely sequenced, *A. thaliana* and *Populus*, allowed us to identify clear clusters of paralogous and orthologs

genes. Finally, the expression profiles of all 26 *Dof* genes was studied by RT-qPCR in nine vegetative and reproductive grapevine organs.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A videira (*Vitis vinifera* L.) é a espécie frutífera de maior área cultivada no mundo e a mais importante em termos econômicos, totalizando 7,5 milhões de hectares (ha) cultivados em 177 países. Com 76.400 ha de área cultivada com videira, o Brasil é o 15º produtor mundial, totalizando, no ano de 2007, cerca de 1.371.560 toneladas (t) métricas (FAO, 2007, www.fao.org, acessado em 10/12/2009). Atualmente, os grandes estados brasileiros produtores de uva são Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Bahia, Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais (Mello, 2007).

As condições ambientais do trópico brasileiro, em suas diferentes regiões, possibilitam a planificação da produção de uvas ao longo do ano. Isso garante oferta permanente de uvas de boa qualidade, com ampla possibilidade de ocupar espaço em períodos de desabastecimento no fornecimento internacional (abril-junho e novembro-dezembro), quando os preços são particularmente atrativos (Leão, 2001). No entanto, a utilização de cultivares de uva com sementes tem impedido o crescimento das exportações brasileiras em virtude da demanda internacional por uvas sem sementes ou apirênicas. A falta de cultivares apirênicas adaptadas às condições ambientais do Brasil além de limitar a capacidade de exportação, afeta a competitividade da uva brasileira também no mercado interno, aberto à comercialização de uvas importadas (Mello, 2002b, Protas et al., 2003). No Estado do Rio Grande do Sul, maior pólo vitícola do país, a falta de adaptação das cultivares apirênicas importadas de uvas de mesa teve um reflexo semelhante na produtividade das mesmas, destacando-se a baixa fertilidade das gemas e a necessidade de manejo com uso intenso de reguladores de crescimento (Henrique P. dos Santos, comunicação pessoal).

A queda nas exportações brasileiras de uva fresca, que chegou a mais de 12.500 t em 1993, caindo para cerca de 4.000 t no período de 1996 a 1998, foi causada principalmente pela falta de produção de uvas apirênicas, demandadas pelo mercado importador. Como consequência, foram concentrados esforços no sentido de adaptar tecnologias para viabilizar a produção de uvas apirênicas no Brasil, utilizando-se cultivares importadas. A partir de 1993, foram conduzidos vários experimentos com este objetivo (Camargo et al., 1997). Essas iniciativas levaram à conclusão de que é extremamente difícil superar as dificuldades de adaptação das cultivares importadas, com maior valor comercial, como é o caso de *Thompson Seedless* (Sultanina), *Superior Seedless*, *Crimson Seedless* e outras, cuja produtividade é baixa e inconstante frente ao

clima tropical brasileiro. Além disso, todas essas cultivares são de extrema suscetibilidade às doenças fúngicas como míldio (*Plasmopara viticola*) e oídio (*Uncinula necator*; Camargo et al., 1997). Apesar de todas as dificuldades e limitações, essas mesmas variedades vêm sendo utilizadas por falta de outras opções e, graças ao intenso esforço do produtor brasileiro, tem permitindo um expressivo crescimento da exportação. Em 2002, o Brasil exportou em torno de 26.000 t de uva, proporcionando divisas anuais de aproximadamente 28 milhões de dólares (Mello, 2002b). A expectativa era que o desenvolvimento de variedades apirênicas adaptadas às regiões brasileiras e a resistência às doenças permitiriam crescimentos muito maiores de produtividade. No entanto, para tal desenvolvimento é necessário um conhecimento muito mais aprofundado sobre a natureza dos processos de adaptação, resistência e apirenia da videira.

O fruto da videira passa por mudanças físicas e bioquímicas bem definidas durante o desenvolvimento, particularmente durante o processo de amadurecimento (Conde et al., 2007). Sendo uma fruta do tipo não climatérica, isto é, não possui a capacidade de amadurecer após a colheita (Giovannoni, 2001), o desenvolvimento das bagas pode ser dividido em três fases. Após a polinização e estabelecimento do fruto, inicia-se uma intensa fase de divisões celulares, crescimento do pericarpo e desenvolvimento lento do embrião, estendendo-se, em média, do 5º ao 30º dia após a antese. Esta etapa é seguida por uma fase de diminuição das divisões celulares na qual o pericarpo cresce vagarosamente por expansão do tamanho celular e a semente entra no processo de maturação. Embora a atividade metabólica seja baixa nesta fase, o embrião desenvolve-se rapidamente (30º ao 45º dia após a antese). A extensão desta fase é que determina se a cultivar será de amadurecimento precoce ou tardio. A última etapa é caracterizada por amolecimento do pericarpo, expansão celular, aumento de diâmetro dos frutos e pela mudança de cor, processo conhecido entre os viticultores como *véraison* (Ollat et al., 2002, Conde et al., 2007). Esta última etapa continua, de acordo com a cultivar, ocorre por mais 35 a 65 dias (Mullins et al., 1992).

Dada a importância agrônômica da ausência de sementes para a obtenção de novas cultivares de uvas de mesa adaptadas às condições climáticas brasileiras, a compreensão da regulação da expressão gênica associada ao desenvolvimento do fruto de uma cultivar sem semente torna-se um pré-requisito essencial para o desenvolvimento de ferramentas aplicadas ao melhoramento genético dessa espécie. Genes fruto-específicos (ou semente-específicos) podem, por exemplo, ser utilizados

estrategicamente na seleção assistida e na modificação do processo de amadurecimento. Entretanto, o sucesso da implementação de uma estratégia de manipulação gênica é dependente do isolamento e da caracterização de genes especificamente expressos durante o desenvolvimento dos tecidos do fruto.

Com esses pré-requisitos em mente, o desenvolvimento do presente trabalho de Doutorado foi orientado com o objetivo geral de contribuir à compreensão, em nível molecular, dos mecanismos que determinam a ausência de sementes em frutos de uva. Para tanto, uma coleção de genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento precoce de uvas sem sementes da cv. apirênica Sultanina foi obtida a partir do emprego da metodologia de análise representacional diferencial (do inglês, *Representational Differential Analysis* ou RDA; Pastorian et al., 2000). Esta técnica permitiu a identificação e a caracterização preliminar da expressão de genes envolvidos nas fases iniciais do desenvolvimento de frutos de uma espécie de uva apirênica.

Os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Construção de bibliotecas subtraídas de cDNA a partir de amostras de RNA total obtidas de frutos da uva apirênica Sultanina em três estádios bem definidos de seus desenvolvimentos, de forma a reunir, em cada biblioteca, cDNAs representativos dos genes mais diferencialmente expressos em cada um dos estádios;
2. Sequenciamento, validação, análise e caracterização de um número significativo de sequências dos cDNAs obtidos em cada uma das bibliotecas específicas a cada estádio;
3. Seleção de genes candidatos utilizando ferramentas de bioinformática e informações da literatura;
4. Confirmação dos níveis de expressão dos genes-candidatos baseada na presença de mRNA (*mRNA steady-state*) por PCR quantitativa em Tempo Real precedida de transcrição reversa (RT-qPCR ou, simplesmente, qPCR);
5. Caracterização mais detalhada do gene candidato cuja expressão possa afetar o padrão de formação dos frutos e/ou sementes, conforme a função biológica hipotética do gene identificado e confirmado por RT-qPCR.

FORMATO E ORGANIZAÇÃO DA TESE

A presente Tese de Doutorado está dividida em quatro capítulos. Uma ampla revisão bibliográfica está apresentada no Capítulo I. Destacam-se, nesta revisão, aspectos relevantes sobre a botânica da videira, a importância econômica da viticultura, o desenvolvimento do fruto da videira, a apirenia e, por fim, aspectos fisiológicos e moleculares da formação dos frutos e sementes da videira.

Um manuscrito redigido conforme norma do periódico *Plant Cell Reports* está apresentado como Capítulo II da Tese. Neste, o conjunto de experimentos com respeito aos quatro primeiros objetivos específicos acima relatados está descrito. Os genes diferencialmente expressos durante os estádios iniciais de desenvolvimento do fruto da cv. apirênica Sultanina de videira utilizando a metodologia de RDA estão identificados, bem como a validação destes genes estágio-específicos selecionados utilizando a metodologia de RT-qPCR.

Um estudo mais aprofundado acerca de genes da videira codificadores de potenciais fatores de transcrição da família Dof está descrito no Capítulo III. Estes genes foram identificados como atuantes promissores no desenvolvimento de frutos sem sementes conforme apresentado no Capítulo II. O Capítulo III também está apresentado na forma de manuscrito, a ser submetido ao periódico *Plant Physiology* para possível publicação. Neste Capítulo, estão apresentadas a identificação e anotação dos genes *Dof* de videira, a análise filogenética das proteínas Dof e a análise da expressão dos 26 membros da família de proteínas Dof por RT-qPCR em videiras da cv. *Pinot Noir*.

Finalmente, uma Discussão Geral finaliza esta tese como Capítulo IV, abordando de forma mais genérica todos os resultados obtidos frente à bibliografia existente, bem como a apresentação de perspectivas para o futuro trabalho nesta área.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. O GÊNERO *VITIS*

A Botânica Sistemática situa a videira, gênero *Vitis* L. na divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Rhamnales, família Vitaceae (Cronquist, 1981). A divisão Magnoliophyta também é conhecida como Angiospermae e é caracterizada por plantas com raiz, caule, folha, flores, frutos e sementes. A classe Magnoliopsida ou Dicotyledoneae é composta por plantas cujas sementes têm duas folhas cotiledonares na fase de plântula. Os representantes da subclasse Rosidae têm flores com pétalas livres e geralmente nectários. Na ordem Rhamnales, as plantas são lenhosas e apresentam um só ciclo de estames opostos às pétalas. Na família Vitaceae, às vezes mencionada como Ampelidaceae na literatura, o cálice das flores é pouco desenvolvido, as pétalas da corola têm prefloração valvar e são soldadas na porção superior. O gineceu é geralmente bicarpelar e bilocular e o fruto é uma baga (Pommer, 2003).

A família Vitaceae é subdividida em subfamílias, estando o gênero *Vitis* posicionado na subfamília Ampelidae, da qual fazem parte, também, os subgêneros *Ampelopsis*, *Cissus*, *Parthenocissus* e *Ampelocissus*, empregados com fins ornamentais. As espécies silvestres do gênero *Vitis* são dióicas, isto é, as plantas são unissexuais masculinas ou femininas. Espécies, híbridos e cultivares encontradas sob cultivo, no entanto, apresentam flores hermafroditas após intensa seleção feita pelo homem, por meio de vários cruzamentos intra e interespecíficos (Pommer, 2003, This et al., 2006).

Foex (1895, cit. In Galet, 1993) dividiu o gênero *Vitis* em dois subgêneros, *Euvtis* e *Muscadinia*. Segundo Galet (1993), os subgêneros correspondem a seções de iguais nomes, estando as espécies agrupadas de acordo com sua morfologia externa e sua origem geográfica. A seção *Muscadinia* agrupa plantas com 40 cromossomos, de gavinhas simples, caule sarmentoso com lenticelas, feixes liberianos dispostos irregularmente, córtex esfoliável e nós sem diafragma. Os frutos têm baixo teor de açúcar. As espécies desta seção são *V. rotundifolia* Michx, *V. munsoniana* Simpson ex Munson e *V. popenoei* Fennell, destacando-se a primeira como a mais importante.

A seção Euvitis agrupa plantas com 38 cromossomos, com gavinhas compostas ou bifurcadas, córtex esfoliável e nós com diafragma. As espécies desta seção estão agrupadas em onze séries, destacando-se algumas como as mais importantes: *V. vinifera* L. e sua ancestral, *V. silvestris* Roth, *V. candidans* Engelm. Ex A. Gray, *V. labrusca* L., *V. berlandieri* Planch., *V. aestivalis* Michx., *V. linsecumii* Buckley., *V. cordifolia* Lam., *V. moticola* Buckl., *V. riparia* Michx., *V. rupestris* Scheele e *V. amurensis* Rupr (Pommer, 2003).

1.1 A Espécie *Vitis vinifera* L.

A denominação científica da videira, parreira ou simplesmente “uva” é *Vitis vinifera* L., com sinonímia de *Vitis sativa* L. É ela a principal representante da família botânica Vitaceae. É uma planta trepadeira com gavinhas, lenhosa e de porte arbustivo. Suas folhas são alternas, pecioladas, cordiformes, com cinco lóbulos sinuados dentados, glabras na parte superior e tomentosas na parte inferior. As flores são pequenas e de cor branco-esverdeadas, dispostas em racimos. Os frutos são bagas reunidas em cachos, contendo cada uma duas ou três sementes, variando de cor de acordo com o tipo de uva (Pommer, 2003).

A uva é cultivada desde o início da domesticação de plantas e animais há cerca de 11.000 anos, na área conhecida como Crescente Fértil do Mediterrâneo Oriental, em terras que hoje constituem Líbano, Síria, Turquia, Irã, Jordânia, Iraque e Israel. A videira é tão antiga quanto as primeiras espécies vegetais cultivadas pelo ser humano, como o trigo (*Triticum aestivum*), a cevada (*Hordeum vulgare*), a lentilha (*Lens culinaris*), a ervilha (*Pisum sativum*), o grão-de-bico (*Cicer arietinum*), a fava (*Vicia spp.*), a oliveira (*Olea europaea*), a tamareira (*Phoenix dactylifera*), a romã (*Punica granatum*) e o linho (*Linum usitatissimum*). O vinho de uvas e a cerveja feita de cereais foram usados já naqueles tempos. Além disto, as folhas, os frutos e as sementes da videira são utilizados na medicina desde a Antiguidade. Pela seleção de determinadas linhagens dessas plantas pelo ser humano, suas características foram alterando-se gradualmente, tornando-se mais adequadas para a coleta, o armazenamento e o beneficiamento. À medida que o processo de seleção desenvolvia-se, criava-se um vínculo entre a humanidade e a planta (Raven, 2001).

Na família Vitaceae, existem duas subespécies de *Vitis vinifera*, a *sativa* e a *silvestris*. Esta separação histórica em subespécies foi baseada em diferenças

morfológicas. As cultivares são geralmente classificadas de acordo com a destinação das suas produções finais: uvas para vinho, uvas de mesa e uva passa. A domesticação da uva parece ter ligação com a descoberta do vinho e durante este período a biologia da uva passou por diversas mudanças dramáticas e cruciais. Dentre elas citam-se a alteração do tamanho dos cachos e das bagas, a mudança de plantas selvagens dióicas para plantas cultivadas hermafroditas e a alteração na morfologia da semente. Tais mudanças garantem maior conteúdo de açúcar para uma melhor fermentação, maiores rendimentos e uma produção mais regular. Estas características são usadas nas análises de remanescentes arqueológicos para diferenciar uvas cultivadas de selvagens (Figura 1; This et al., 2006).

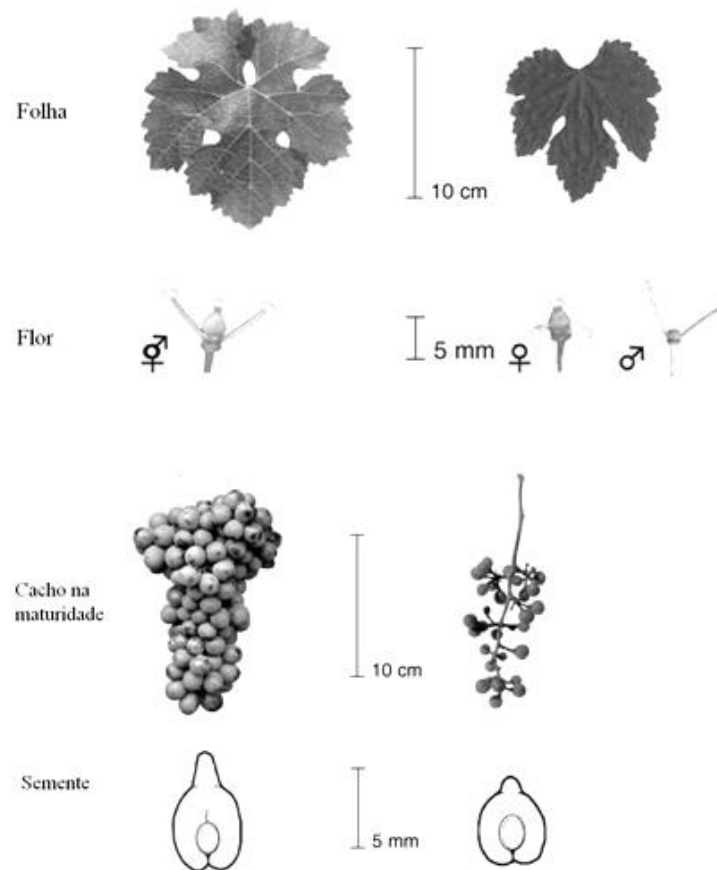


Figura 1. Diferenças morfológicas entre subespécies de videiras cultivadas (subespécie *vinifera*) (à esquerda) e selvagens (subespécie *silvestris*) (à direita). São mostradas a diferença na folha, flor (macho e fêmea para *silvestris*), o cacho na maturidade e as sementes (modificada de This et al, 2006).

2. ASPECTOS ECONÔMICOS DA VITICULTURA

A produção mundial de uvas evoluiu de 42,98 milhões t no início da década de 1960 para aproximadamente 66,50 milhões t em 2007. A maior produção mundial de uvas ocorreu em 2004, atingindo a cifra de 67,09 milhões t, não muito diferente da produção de 2007, que alcançou 66,50 milhões t (FAO, 2007, www.fao.org, acessado em 10/12/2009).

De acordo com dados atuais, o maior produtor mundial é a Itália, com 8,5 milhões t, seguido pela China, Estados Unidos, França, Espanha e Turquia, cujas produções são de 6,7, 6,3, 6,0, 5,6 e 3,6 milhões t, respectivamente. O Brasil ocupa a 15ª posição, cuja produção é de 1,37 milhões t (FAO, 2007, www.fao.org, acessado em 10/12/2009).

Embora seja observada uma estabilidade na produção mundial a partir de 1980, um comportamento bastante variável ocorreu nos últimos 44 anos na produção individual dos diversos países viticultores. Na Itália e na França, onde a maior parte da produção destina-se à fabricação de vinhos, o consumo diminuiu a partir do final do século XX. Um pico de produção foi observado nesses dois países na década de 1980, seguido por um período de redução e posterior estabilização em função das políticas de controle de produção. Em contrapartida, a viticultura cresceu significativamente em países como Austrália, Brasil, Chile, Egito, Alemanha, Índia, Irã, África do Sul, Espanha e Estados Unidos. Destaque especial foi o crescimento da produção da viticultura na Índia e, principalmente, na China, que passaram a ocupar percentuais significativos do total mundial (Kishino et al., 2007).

A área cultivada com videiras seguiu a mesma curva da produção, apresentando um pico na década de 1980, um período de queda até 1995 para, então, manter-se estável, com área total cultivada de 7,50 milhões de ha em 2007 (FAO, 2007, www.fao.org, acessado em 10/12/2009). Novamente, tal estabilidade foi obtida pela associação entre a grande redução de área de cultivo na Itália, França, Grécia, Romênia, Espanha e Turquia e o aumento nos demais países produtores (Pommer, 2003).

A produtividade média mundial também cresceu significativamente no período entre 1961 e 2007, passando de 4,6 t/ha para 8,9 t/ha. Diferentemente da área cultivada ou da produção, a produtividade, após uma fase de incremento com o desenvolvimento das técnicas de cultivo, tem indicado tendência de estabilização nos diversos países, objetivando a obtenção de elevados níveis de qualidade para mercados cada vez mais

exigentes. A exportação mundial de uvas tem crescido a cada ano, desde a década de 1960. O aumento populacional, associado à procura por alimentos saudáveis, tem aumentado o mercado de frutas. A uva, devido às suas características organolépticas, é um produto bastante apreciado nos diversos mercados, principalmente na Europa, região tradicional no seu cultivo e consumo. O interesse do consumidor, associado às condições climáticas específicas dos diversos países produtores, as quais permitem uma alternância de oferta de produto ao longo do ano, proporcionou crescimento significativo no comércio mundial. Os maiores exportadores são, em ordem decrescente, Chile, Itália, Estados Unidos e África do Sul, que detiveram 58,3% do mercado em 2004 (Kishino et al., 2007).

No Brasil, o cultivo da videira começou em 1535, trazida pelos portugueses à Capitania de São Vicente, atuais estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. A imigração italiana em São Paulo e no Rio Grande do Sul no final do século XIX deu um grande impulso à cultura. Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Bahia, Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais são, atualmente, os grandes estados produtores brasileiros. As melhores épocas de produção variam com as características climáticas de cada região. A uva é uma das frutas mais exportadas e também uma das mais importadas pelo Brasil. Uvas chilenas, americanas e argentinas têm, no Brasil, um mercado cada vez maior (Mello, 2002a).

Diferentemente de seus concorrentes no mercado mundial, que possuem condições excelentes para o cultivo da videira, o Brasil não apresenta as condições ideais para o cultivo desta frutífera, apesar da diversidade climática. Assim, o Brasil possui pequena importância no mercado mundial, participando com apenas 0,94% do volume total comercializado de uvas, atendendo às lacunas não ocupadas pelo Chile e África do Sul. Por se situar mais ao Norte, o Brasil realiza colheitas em períodos diferentes desses exportadores tradicionais do Hemisfério Sul. Desse modo, o crescimento da produção e, principalmente, da exportação, tem sido alcançado com muito esforço por parte dos envolvidos no agronegócio da uva (Mello, 2002b).

O Brasil possui cerca de 76.400 ha de videiras, dos quais 50% são cultivados com uvas finas e comuns destinadas ao consumo *in natura* (dados da FAO, 2007, www.fao.org, acessado em 10/12/2009). A produção de uvas com esta finalidade está baseada, predominantemente, na cv. Niágara Rosada, no caso de uvas comuns. As uvas finas de mesa são divididas em dois tipos em virtude da presença ou ausência de sementes. As cultivares Itália, Rubi, Benitaka, Brasil e Red Globe são as principais uvas

finas com sementes, e as *Centennial Seedless*, *Superior Seedless* (Festival), *Thompson Seedless* (Sultanina), *Catalunha* e *Crimson Seedless* caracterizam as cultivares sem sementes de uvas finas de mesa (Kishino et al., 2007). A exigência do mercado consumidor por uvas sem sementes tem estimulado, recentemente, um grande número de produtores a investirem nessas últimas cultivares. Entretanto, a produção dessas cultivares tem sido fortemente limitada pela baixa produtividade e inconstância na produção ao longo de ciclos subseqüentes.

O Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro de uva, sendo responsável por 51,1% da produção nacional. Esta produção passou de 461.290 t entre 1998 e 2000 para 519.138 t entre 2001 e 2003. Entre 2004 e 2006, a produção alcançou a marca de 644.115 t. A região da serra Rio-grandense é a maior produtora, com 80,86% do total gaúcho, ou seja, 520.823 t. Todos os municípios com produção superior 10.000 t localizam-se nesta região, destacando-se Bento Gonçalves, com 114.780 t (17,82%), Flores da Cunha, com 82.040 t, Caxias do Sul, com 49.727 t, Farroupilha, com 48.736 t, e Garibaldi, com 41.940 t. Cabe salientar que, recentemente, municípios situados nas regiões da Fronteira Oeste (Santana do Livramento) e Campanha (Bagé), vêm aumentando sua participação na produção de uva, como resultado do desenvolvimento da vitivinicultura nestas regiões (dados do SEPLAG/RS, www.seplag.rs.gov.br, acessado em 10/12/2009).

Além do aspecto econômico, há um crescente interesse na bebida derivada da uva como fonte de metabólitos secundários potencialmente benéficos para a saúde humana (Bagchi et al., 2003, Spiller et al., 2003) como os polifenóis antioxidantes (Ferguson, 2001, Aldini et al., 2003). Aproximadamente 71% da produção de uvas (66.901,419 toneladas) é utilizada para vinhos, sucos e destilados, 27% consumido in natura e 2% como fruta desidratada (Conde et al., 2007).

3. CULTIVARES DE UVAS APIRÊNICAS

Thompson Seedless é a cultivar de uva de mesa sem sementes mais plantada e comercializada no mundo. Conhecida também pelo nome de Sultanina (do inglês, *Sultanine*), esta cultivar é originária da Ásia Menor onde é conhecida originalmente pelo nome de Kishmish Branca (Dangl et al., 2001), e foi introduzida na Califórnia (EUA) por William Thompson. Atualmente, esta cultivar representa o principal

genótipo doador de apirenia nos programas de melhoramento da videira no mundo, podendo-se destacar as características agrônômicas do fruto (Mashima, 2000). Seus cachos são grandes, pesando entre 400 e 600 g, acentuadamente alados, cilindro-alongados e compactos. As bagas são uniformes, de tamanho médio, pesando entre 4 a 5 g, oval-alongadas, de cor esverdeada ou levemente dourada quando bem maduras, sem sementes, de textura firme e sabor neutro. As bagas apresentam baixa aderência ao pedicelo e são de maturação média.

As plantas de Sultanina são muito vigorosas e produtivas, devendo ser podadas em ramos bem longos, de 15 a 20 gemas. Os principais aspectos do seu cultivo dizem respeito à localização das gemas frutíferas (a partir da 5ª gema), que determina seu sistema de poda em ramos bem longos. A condução dos ramos é realizada de forma a permitir boa exposição à luz. A planta necessita, além desses cuidados, de operações para a melhoria da qualidade das bagas e dos cachos, o que inclui anelamento, pulverizações com giberelina e o desponte dos cachos (Manica & Pommer, 2006).

A cultivar Sultanina é a uva apirênica mais plantada no Brasil. As uvas *Festival Seedless* e *Crimson Seedless* vêm sendo produzidas no Vale do Submédio São Francisco (Pólo Petrolina-Juazeiro). A uva *Centennial Seedless* é principalmente produzida no Noroeste do Estado de São Paulo. Enquanto as primeiras têm por destino o mercado externo, esta última é produzida para atender à demanda do mercado interno. Todas elas, no entanto, necessitam de atenção e cuidados agrônômicos intensos em virtude da baixa adaptabilidade aos ambientes brasileiros e à suscetibilidade a doenças fúngicas (Pommer, 2003).

Diante desse cenário e ciente da sua missão de gerar soluções tecnológicas para essa cadeia produtiva, a Embrapa Uva & Vinho (Bento Gonçalves, RS) iniciou, em 1996, um audacioso programa de melhoramento genético que culminou com o lançamento das primeiras cultivares de uvas sem sementes adaptadas às condições tropicais brasileiras, a BRS Morena, a BRS Clara e a BRS Linda (Camargo et al., 2003a, 2003b, 2003c; ver Figura 4, adiante).

A BRS Linda e a BRS Clara são uvas brancas e BRS Morena um tipo de uva preta. As novas frutas foram desenvolvidas por meio do melhoramento genético tradicional e são indicadas para consumo e comercialização tanto no mercado interno quanto no externo (Camargo et al., 2003a, 2003b, 2003c).

A cultivar BRS Clara se caracteriza pela coloração verde-amarelada e pela produtividade elevada, chegando a 30 t por ha por ano. A BRS Linda tem coloração verde e fertilidade alta, normalmente dois cachos por ramo, podendo produzir o equivalente a 47 t por ha por ano. A acidez e o baixo teor de açúcar permitem a caracterização, para efeito comercial, como uma uva light ou diet. A BRS Morena é um tipo precoce, também com alta fertilidade, e produtividade na ordem de 20 a 25 t por ha por ano (Camargo et al., 2003a, 2003b, 2003c).

As novas espécies são recomendadas para plantio no Noroeste de São Paulo, Norte de Minas Gerais e no Vale do Submédio do São Francisco, pois são adaptadas ao cultivo em regiões tropicais (Camargo et al., 2003a, 2003b, 2003c).

4. DESENVOLVIMENTO DO FRUTO DA VIDEIRA

A videira é uma planta sarmentosa que, ao ser explorada economicamente, com raras exceções, deve estar apoiada em algum tipo de suporte, onde seus ramos são conduzidos e distribuídos em harmonia com o vigor da planta de modo a promover boa captação de energia solar e aproveitamento dos nutrientes em benefício de uma melhor produtividade e qualidade da uva (Kishino et al., 2007).

A maioria das cultivares de uva é altamente florífera e as inflorescências são formadas na maior parte dos nodos ao longo da cana. Dependendo da cultivar, cada broto latente contém mais de três inflorescências e cada inflorescência pode conter mil flores. Destas flores, 70 a 80% normalmente não evoluem para frutos maduros; elas secam e caem. O termo *Fruit Set* (DS0) é empregado para descrever a transformação de flores em frutos, isto é, o “estabelecimento dos frutos”. DS0 pode referir-se, também, à porcentagem de flores em uma inflorescência a qual se transforma em frutos (comumente de 20 a 30%) ou ao processo fisiológico envolvido nos estádios iniciais de desenvolvimento do fruto (Mullins et al., 1992).

Em cultivares de uvas, o crescimento da baga é iniciado pela polinização e fertilização. As flores que não são polinizadas ou que, mesmo fertilizadas apresentam erros de desenvolvimento, geralmente abortam ou, como já dito, secam e morrem. Nas flores restantes, há um recomeço de divisões celulares no pericarpo e as bagas iniciam seus crescimentos. No entanto, muitas destas bagas em desenvolvimento destacam-se dos cachos durante as próximas duas ou três semanas por um processo natural de

abscisão, possivelmente desencadeado por erros no processo de desenvolvimento. Assim, apenas as bagas adequadamente polinizadas, fertilizadas e com desenvolvimento normal seguem um ativo crescimento presas ao cacho. A etapa de DSO em videira é completada dentro de duas ou três semanas a partir da antese. Não há um período bem definido de abscisão dos frutos. Como descrito, a abscisão pode ser desencadeada internamente pelo vegetal ou como resultado de condições ambientais desfavoráveis tais como estresse hídrico, ventos e danos mecânicos (Mullins et al., 1992).

Os frutos da videira são divididos em três principais tipos de tecidos, ou seja, casca, polpa e semente (Figura 2). Durante o desenvolvimento dos frutos da videira, ocorrem modificações em tamanho, composição, cor, textura, sabor e na suscetibilidade a patógenos. Os frutos da videira são não-climatéricos, isto é, não possuem a capacidade de amadurecer após a colheita (Giovannoni, 2001) e apresentam um padrão de crescimento em dupla curva sigmóide e pode ser claramente dividido em três estádios distintos: I, uma fase inicial de rápido crescimento; II, a chamada fase Lag, de baixo ou ausência de crescimento; e III, a fase final de crescimento e maturação (Figura 3; Coombe, 1992).

O crescimento ocorre primeiramente pela divisão celular, seguida pela expansão celular. Do início do florescimento até aproximadamente 60 dias, ocorre uma fase de rápido crescimento durante a qual é formada a baga, e as sementes dos embriões são produzidas. Diversos solutos são acumulados durante o primeiro período, contribuindo para a extensão da expansão do fruto, e alcançando um pico máximo visível em torno de 60 dias após o florescimento (Possner & Kliwer, 1985, Ollat et al., 2002, Conde et al., 2007). Os compostos mais prevalentes entre todos são principalmente os ácidos málico e tartárico. O ácido tartárico é acumulado durante os estádios iniciais do desenvolvimento do fruto e sua concentração é mais alta na periferia do fruto em desenvolvimento. Em contraste, o ácido málico é acumulado em células da polpa no final da primeira fase de desenvolvimento. Esses ácidos conferem acidez para o vinho e são, dessa forma, críticos para sua qualidade. Ácidos hidroxicinâmicos são também acumulados durante o desenvolvimento inicial dos frutos. Eles são distribuídos na polpa e na casca e importantes por estarem envolvidos em reações de escurecimento (do inglês, *browning*), sendo eles os precursores dos fenóis voláteis (Romeyer et al., 1983). Taninos, incluindo catequinas monoméricas, são também acumulados durante o primeiro período do desenvolvimento dos frutos e estão presentes na casca e nas sementes, mas ausentes na polpa (Kennedy et al., 2000a, 2000b, 2001). Diversos outros

compostos como minerais, aminoácidos, micronutrientes e componentes aromáticos são também acumulados durante a primeira fase de desenvolvimento e afetam a qualidade da uva e do vinho, determinando, também, alterações e identidades sensoriais tanto para os frutos como para seus produtos.

Após a primeira fase do desenvolvimento do fruto da videira segue-se uma fase denominada *lag* (Figura 3). A duração desta fase é específica de cada cultivar considerada e o final dela corresponde ao final da fase herbácea do fruto. Embora o primeiro período de desenvolvimento contribua para a qualidade da uva, o evento mais importante é, exatamente, este segundo período, durante o qual ocorre um massivo aumento de compostos, principalmente glicose e frutose, como resultado de mudanças bioquímicas naturais do amadurecimento do fruto (Mullins et al., 1992).

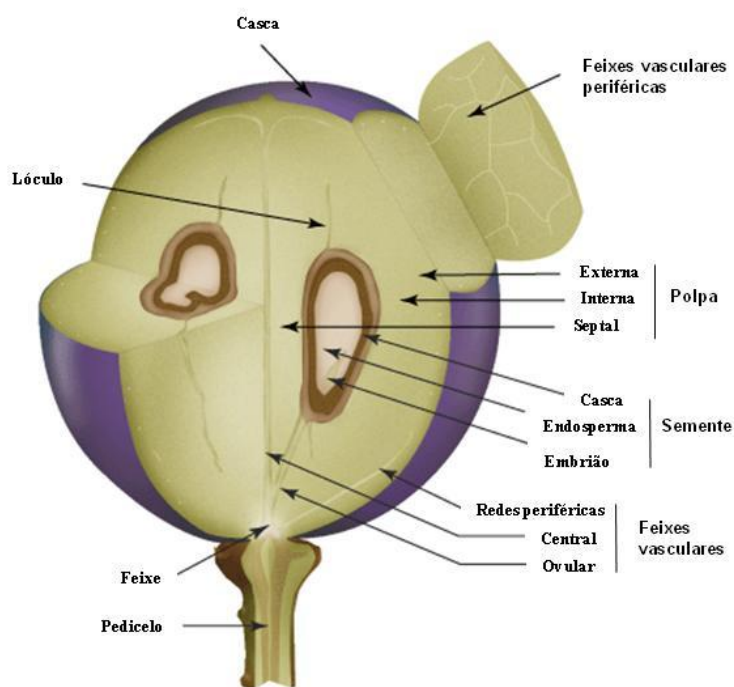


Figura 2. Estrutura de um fruto de uva maduro seccionado parcialmente ao longo eixo central, permitindo visualizar, as partes internas (Combe & Clancy, 2001).

A palavra francesa *véraison*, usada para descrever a mudança na cor da casca da baga, indica o início do amadurecimento. Esta palavra tem sido adotada internacionalmente para descrever tal etapa. As mudanças mais dramáticas na composição do fruto da videira ocorrem durante esta terceira fase de desenvolvimento,

ou fase de amadurecimento. As bagas mudam de um estado onde elas são pequenas, duras e ácidas, com baixo teor de açúcar, para um estado onde elas tornam-se maiores, macias, doces, menos ácidas, saborosas e intensamente coloridas. O sabor das bagas é o resultado do balanço ácido/açúcar e, também, da síntese de diversos metabólitos secundários que determinam notas de sabor e aroma, especialmente flavonóides. O desenvolvimento destas características determinará amplamente a qualidade do produto final (Boss & Davies, 2001, Conde et al., 2007).

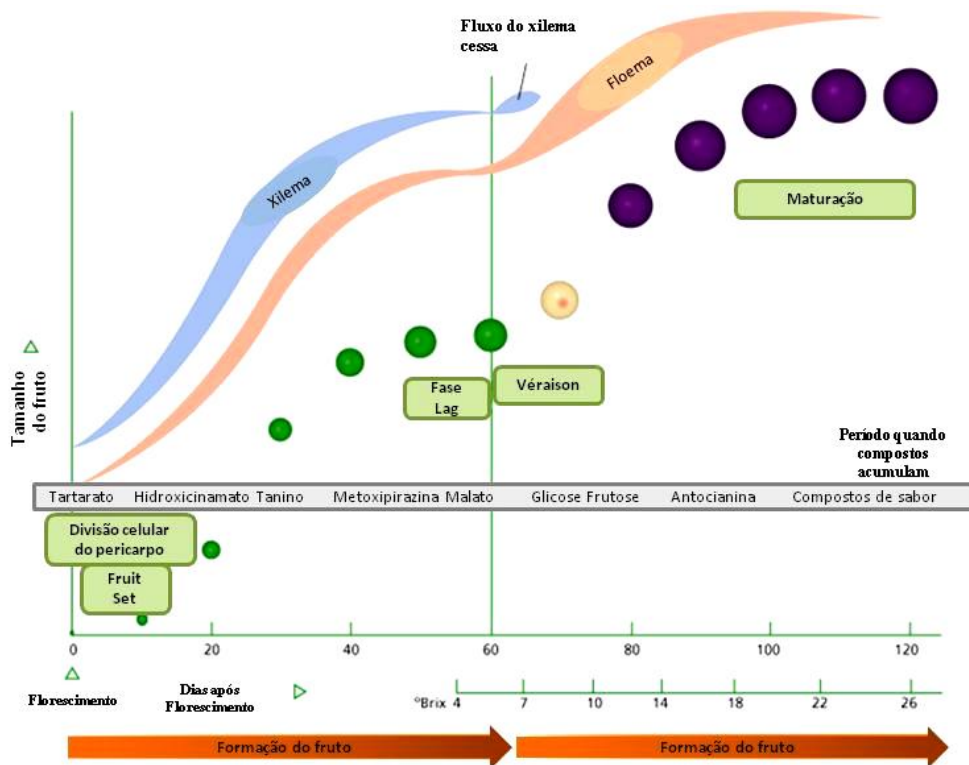
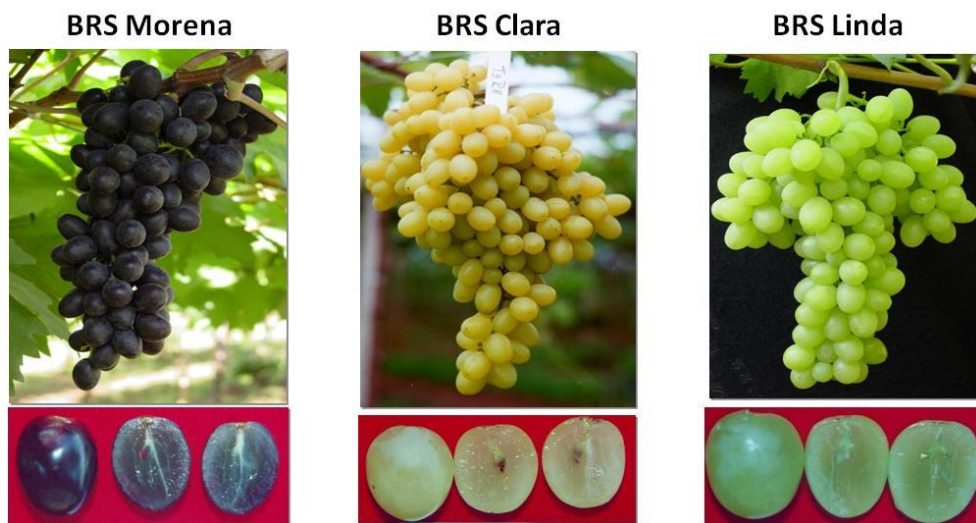


Figura 3. Representação dos principais estádios e fenômenos fisiquímicos do desenvolvimento dos frutos da videira. Na figura, pode-se observar as mudanças de tamanho e cor de bagas com intervalos de 10 dias desde o florescimento, passando pelos maiores eventos de desenvolvimento (caixas em cor verde). São também mostrados os períodos de acúmulo de compostos, os níveis “brix” e a indicação da taxa de influxo de sucos vasculares derivados do xilema e floema para os frutos (Combe & Clancy, 2001).

A



B

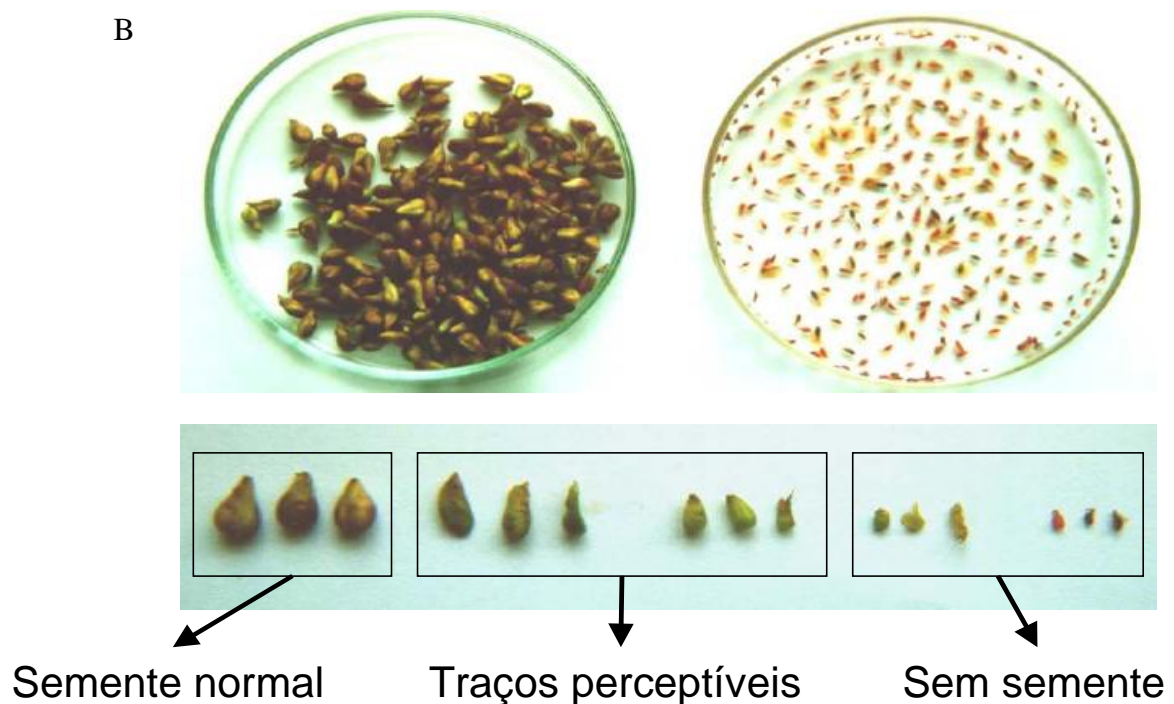


Figura 4. Cultivares de uva sem sementes desenvolvidas na Embrapa Uva & Vinho (Bento Gonçalves, RS) e variação da expressão fenotípica da estenoespermocarpia na videira. (A) BRS Morena, BRS Clara e BRS Linda e detalhe do fruto. (B) Variação da expressão da estenoespermocarpia observada na videira com a definição da aparência das sementes. Fonte: acervo da Embrapa Uva e Vinho.

Geralmente, as bagas dobram de tamanho entre o *véraison* e a colheita. Muitos dos solutos acumulados nos frutos da videira no primeiro período de desenvolvimento permanecem até a colheita. Suas concentrações, no entanto, são reduzidas devido ao aumento do volume da baga. Outros compostos produzidos durante o primeiro período são, de fato, reduzidos (e não simplesmente diluídos) na relação básica por baga durante o segundo período de desenvolvimento do fruto. Entre estes está o ácido málico, o qual é metabolizado e usado como um recurso de energia durante a fase de amadurecimento, resultando em um significativo decréscimo dos seus níveis relativos aos níveis de ácido tartárico. Este último apresenta uma concentração geralmente constante após o *véraison*. Os taninos e compostos aromáticos também diminuem consideravelmente na relação básica por baga durante o amadurecimento do fruto.

4.1 A Regulação hormonal do desenvolvimento do fruto da Videira

Os primeiros passos de desenvolvimento do fruto, da fecundação até o início do DS0, estão sob o controle de hormônios do desenvolvimento, principalmente auxinas, citocininas e giberelinas (GAs), os quais promovem a divisão e a expansão celular, bem como o estímulo e a inibição da produção dos diversos compostos químicos componentes dos frutos. Embora esses hormônios possam ser importados para os frutos, eles são, na sua maioria, produzidos pelas sementes ou por tecidos maternos como os óvulos não fertilizados, no caso de variedades sem sementes. No entanto, o mecanismo de produção de citocininas pelas sementes não é completamente estabelecido para todas as espécies de plantas. Assim, o tamanho final e a velocidade de crescimento de uma baga depende do número de sementes que ela contém (Conde et al., 2007).

Em videiras, os hormônios auxinas, citocininas e GAs alcançam uma concentração máxima justamente antes do *véraison* e, então, diminuem bruscamente ao longo do amadurecimento. O controle hormonal do amadurecimento do fruto da videira, do *véraison* à colheita, não está ainda muito esclarecido e pode resultar de uma combinação de sinais ou estar sob o controle de um único hormônio (Coombe, 1992, Blouin & Guimberteau, 2000). Notadamente no desenvolvimento de flores ou gavinhas, o balanço entre GAs e citocininas possui papel de destaque. As GAs inibem as inflorescências e promovem o desenvolvimento das gavinhas. As citocininas, por sua

vez, induzem a produção de inflorescências a partir de meristemas de gavinhas (Boss & Thomas, 2002).

As GAs induzem o alongamento de entrenós em alguns tipos de plantas, como em espécies anãs ou em roseta e gramíneas. Outros efeitos fisiológicos da GA incluem alterações na juvenilidade e sexualidade da flor e na promoção do estabelecimento e crescimento do fruto e germinação de sementes (Taiz & Zeiger, 2006).

A aplicação de GA exógena estimula o aborto de sementes e quando presentes em sementes estenoespermocárpicas são necessárias para promover o desenvolvimento do embrião a partir de uma rápida diminuição no atraso de seu crescimento. Assim, parece que a GA exógena não imita o processo natural do aborto do embrião que ocorre em uvas estenoespermocárpicas e que seus efeitos são exercidos através de outros mecanismos. As GAs poderiam ser, no entanto, um dos fatores que interagem em um fenômeno complexo envolvido no vigor da planta (Agüero et al., 2000).

As GAs, possivelmente em associação com outras substâncias como auxinas ou etileno, provavelmente conduzem uma proeminente parte da apirenia. As GAs são um grupo de hormônio natural de planta que estão envolvidas em vários aspectos de crescimento e desenvolvimento. Estes compostos têm sido aplicados em numerosas plantas cultivadas para estimular vários aspectos de crescimento e promover atributos benéficos (Taiz & Zeiger, 2006). As GAs, além de atrasar o amadurecimento, são efetivas na promoção da apirenia em uvas com sementes, na supressão do desenvolvimento de vestígios de sementes em uvas normalmente apirênicas, no aumento do tamanho dos frutos e dos cachos e na diminuição da compactação dos cachos (Costantini et al., 2008).

Os mecanismos pelos quais o fitormônio ácido indol-3-acético ou AIA (do inglês *indole-3-acetic-acid* ou IAA) regula o desenvolvimento do fruto são complexos e não são ainda completamente entendidos. A auxina é produzida no pólen, no endosperma e no embrião de sementes em desenvolvimento e o estímulo inicial para o crescimento do fruto pode resultar da polinização. A polinização bem sucedida inicia o estabelecimento do fruto, sendo que após a fertilização, o crescimento do fruto depende da auxina produzida nas sementes em desenvolvimento. O endosperma pode contribuir com a auxina durante o estágio inicial do crescimento do fruto e o embrião em desenvolvimento pode ser a fonte principal de auxinas durante os estágios seguintes (Taiz & Zeiger, 2006). Estudos recentes indicaram que concentrações de auxina foram altas durante a fase inicial de desenvolvimento do fruto (Fase I) e diminuíram após

véraison, consistente com o papel deste fitormônio na promoção da divisão e expansão celular durante tal estágio. Esse mesmo estudo mostrou que as concentrações de auxinas permanecem relativamente constantes ao longo do desenvolvimento do fruto (Deluc et al., 2007). Em algumas espécies vegetais, os frutos sem sementes podem ser produzidos normalmente ou induzidos por tratamentos de flores não-polinizadas com auxina (partenocarpia). Estimulando a formação de frutos partenocárpicos, a auxina atua principalmente para induzir o *Fruit set*, o qual por sua vez, desencadeia a produção endógena de auxina dos tecidos do fruto para completar o processo de desenvolvimento (Taiz & Zeiger, 2006).

As citocininas participam na regulação de muitos processos do vegetal, incluindo a divisão celular, a morfogênese da parte aérea e das raízes, a maturação dos cloroplastos, o alongamento celular e a senescência. A citocinina regula o ciclo celular vegetal e é necessária para a divisão celular. A função das citocininas tem sido elucidada por intermédio de sua aplicação exógena, pelo fenótipo de plantas transgênicas que superexpressam citocininas, e pelas plantas transgênicas que possuem uma redução no nível endógeno de citocinina (Taiz & Zeiger, 2006). Na videira, como mencionado anteriormente, esse hormônio alcança uma concentração máxima justamente antes do *véraison* e, então, diminui bruscamente ao longo do amadurecimento do fruto (Boss & Thomas, 2002).

Além de auxinas, citocininas e GAs, três hormônios associados podem regular o processo de maturação dos frutos da videira: ácido abscísico (ABA), etileno e brassinosteróides (BRs). Há um considerável acúmulo de ABA após *véraison*, o que tem papel fundamental na maturação e aquisição da dormência das sementes, e na tolerância do fruto ao estresse por déficit hídrico em estágios finais do amadurecimento (Coombe & Hale, 1973). Além disso, o ABA parece ter um papel essencial no acúmulo de açúcares nos frutos. Isto foi evidenciado pela observação de que um atraso no acúmulo de ABA tem como consequência o atraso na importação de hexoses (Pirie & Mullins, 1976, Davies et al., 1997).

O papel do etileno durante o desenvolvimento e o amadurecimento de alguns frutos não climatéricos foi sugerido na década de 1970 e tem sido recentemente, melhor documentado. A especificidade do hormônio etileno foi claramente relacionada ao amadurecimento dos frutos não climatéricos e em particular na maturação da videira (Coombe & Hale, 1973, Jiang et al., 2003, Giovanonni, 2004). Em uva, um pequeno e transiente aumento da produção de etileno endógeno ocorre justamente antes do

véraison. O etileno é um fito-hormônio relacionado também à maturação de frutos climatéricos. Esta maturação caracteriza-se por um pico de produção de etileno e uma elevação na taxa de respiração no início do amadurecimento (Pilati et al., 2007).

O progresso da genômica funcional fortaleceu a idéia do envolvimento do etileno para o amadurecimento dos frutos não climatéricos a partir da medida das expressões de genes (e das atividades enzimáticas relacionadas) envolvidos na síntese deste hormônio (Giovannoni, 2004, Mailhac & Chervin, 2006, Pilati et al., 2007). Assim, estudos recentes sugerem que o etileno, além de possuir papel crítico no desenvolvimento e no amadurecimento básico do fruto da videira, é responsável pelo aumento do diâmetro das bagas, pela diminuição da acidez e pelo acúmulo de antocianinas. A maioria dos mRNAs identificados durante estes processos codificam genes associados à síntese do etileno e foram preferencialmente localizados na casca. Outros componentes capazes de controlar rotas de sinalização e síntese do etileno foram identificados como expressos no pericarpo. Entre eles, o receptor do etileno, o repressor da ácido 1-aminociclopropanocarboxílico (ACC)-sintase, um repressor EIN3, um regulador positivo de resposta ao etileno e um co-ativador do fator de transcrição de resposta ao etileno (EREBP, do inglês, *ethylene-responsive element-binding protein*). Além disso, a superexpressão de um regulador negativo da síntese de etileno nesses tecidos, denominado CTR1, sugeriu que o etileno pode ser produzido predominantemente no pericarpo. Uma variedade de outros genes potencialmente identificados como fatores de resposta ao etileno (ERFs, do inglês, *ethylene responsive factors*) exibiu padrões de expressão tecido-específicas, sugerindo que suas funções podem, também, ser controladas por outros fatores (Grimplet et al., 2007).

Os Brassinosteróides (BRs) são acumulados durante o desenvolvimento do fruto e parecem ter papel-chave na determinação do início do amadurecimento. O papel dos BRs na maturação de frutos de videiras tem sido recentemente esclarecido. Estes hormônios esteróides estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas, mas suas concentrações em frutos de videira aumentam no início do amadurecimento. Além disso, o tratamento exógeno desses hormônios tem apressado o amadurecimento do fruto e tal tratamento poderia ser a solução que o viticulturistas procuram para sincronizar a maturação das bagas no mesmo cacho (Pilati et al., 2007).

Por meio da aplicação exógena de BRs durante diferentes fases do desenvolvimento das uvas, algumas classes de genes tiveram suas expressões modificadas e associadas às respostas de crescimento do próprio fruto. Entre eles,

destacam-se genes codificadores de enzimas responsáveis pela síntese de castasterona (um BR bioativo *per se*) e de outros fatores que afetam a formação desta mesma classe de reguladores do crescimento (Deluc et al., 2007).

5. A APIRENIA NO FRUTO DA VIDEIRA

Consideram-se apirênicas as espécies de plantas capazes de produzir frutos com ausência completa de sementes, contendo traços de sementes abortadas ou um número muito reduzido de sementes (Varoquaux et al., 2000). Na videira, a apirenia é resultante de dois processos biologicamente distintos: a partenocarpia e a estenoespermocarpia (Pratt, 1971). A partenocarpia define o tipo de apirenia que resulta no desenvolvimento do fruto sem a ocorrência de fertilização. Exemplos deste processo ocorrem nas cultivares *Black Corinth* e *Conrinto Bianco* de videira, produzindo frutos pequenos, esféricos e utilizados somente para a produção de passas (Varoquaux et al., 2000, Adam-Blondon et al., 2001). No processo de estenoespermocarpia, conforme a definição de Stout (1936), o desenvolvimento do embrião e do endosperma inicia após a fertilização, mas degenera prematuramente, levando à produção de frutos contendo traços de sementes não esclerificadas. Cronologicamente, a degeneração do endosperma e a consequente morte do embrião ocorre de três a seis semanas após a antese e o embrião atinge, no máximo, o estágio globular (Figura 5; Pratt et al., 1971, Camargo et al., 1999). Na presente Tese, o termo apirenia, quando utilizado, estará sendo referido para a ausência de sementes no fruto resultante do processo de estenoespermocarpia.

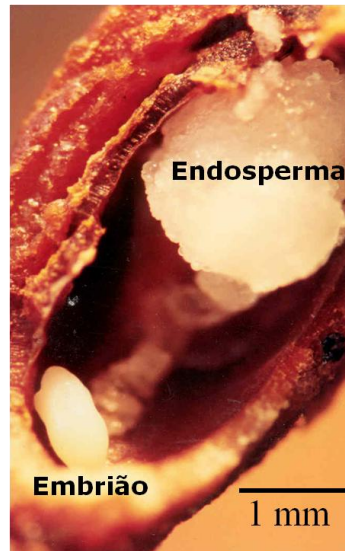


Figura 5. Seção longitudinal de um traço de semente de uva mostrando a degeneração do endosperma. Na fotografia está salientado o embrião e a cavidade resultante da degeneração prematura do endosperma. Imagem adaptada de Camargo et al (1999).

Estudos com o objetivo de estabelecer uma hipótese sustentada para a herdabilidade da apirenia estenospermocárpica remontam a algumas décadas. O trabalho pioneiro de Stout (1936) procurou, por meio de um detalhado apanhado, descrever sobre a genética da apirenia, sugerindo que esta característica é governada por um único gene dominante. No entanto, apesar de inúmeros esforços dos melhoristas nos últimos 70 anos, a herança da estenospermocarpia na videira ainda permanece pouco compreendida. Dependendo dos genótipos envolvidos nos cruzamentos estudados e da avaliação da progênie resultante, hipóteses sugerindo vários genes recessivos, fatores quantitativos (do inglês, *Quantitative Trait Loci* ou QTL) e vários genes dominantes foram relatados (Tabela I, revisão em Bouquet & Danglot, 1996). No entanto, a variação fenotípica observada da expressão da estenospermocarpia nos diferentes estudos é semelhante (Figura 4B).

Tabela I. As diferentes hipóteses propostas para explicar a herança da apirenia em videira.

1 gene recessivo	Constantinescu et al., 1972 Dudnik e Moliver 1976
2 genes recessivos	Bozhinova-Boneva 1978 Spiegel-Roy et al., 1990
Diversos genes recessivos	Weinberger e Harmon 1964 Loomis e Weinberger 1979 Pospisilova e Patenik 1988
Fatores quantitativos	Sandhu et al. 1984 Golodriga et al. 1986
5 genes dominantes	Sato et al. 1994
3 genes dominantes	Ledbetter e Burgos 1994
1 gene dominante	Stout 1937 e 1939 Khachatryan e Martirosyan 1971

Seja qual for a forma de herança, o fato é que, até o final da década de 1970, podia-se esperar frequências de apirênicos na descendência de videiras entre 0 a 35%, 40% ou até, no máximo, 55% (Loomis & Weinberger, 1979). Recentemente, com o uso do resgate de embriões e a cultura *in vitro* de tecidos, o que permite o cruzamento direto entre duas cultivares sem sementes, a frequência pode chegar a valores superiores a 80% (Manica & Pommer, 2006).

Atualmente, a hipótese mais aceita para explicar a genética complexa da estenoespermocarpia foi proposta por Bouquet & Danglot (1996). Nesse estudo, a hipótese formulada pelos autores indica que a expressão da estenoespermocarpia é controlada por três genes recessivos independentemente herdados e controlados por um gene regulador dominante, nomeado *SdI* (do inglês, *Seed development Inhibitor*), o qual inibe o desenvolvimento da semente. Esta hipótese foi testada em diversas populações-modelo e, na maioria dos casos, foi capaz de explicar a segregação observada (Bouquet & Danglot, 1996). Utilizando os mesmos critérios de classificação fenotípica e um

marcador molecular do tipo SCAR (do inglês, *Sequence Characterized Amplified Region* ou Região de Sequência Caracterizada Amplificada) associado à apirenia e desenvolvido por Lahogue et al (1998), Revers et al (2006) obtiveram resultados que sustentam a hipótese proposta por Bouquet & Danglot, (1996). Recentemente, a análise da expressão diferencial entre uma linhagem Sultanina com semente e sem semente identificou um gene codificando uma chaperonina cloroplastídica (ch-Cpn21), cujo silenciamento resultou em aborto de sementes em tabaco e tomate (Hanania et al., 2007).

Para características complexas tais como a apirenia, os benefícios das informações geradas na pesquisa em escala genômica para a cultura da videira são claros, as quais podem aumentar a precisão do melhoramento genético e práticas da viticultura por meio do estabelecimento de correlações entre características moleculares (genes, proteínas e metabólitos) e características de interesse agrônômico.

6. A GENÔMICA DA VIDEIRA

O desenvolvimento de marcadores moleculares para as mais diversas espécies de vegetais ajudou a esclarecer as bases genéticas para características complexas e facilitou a construção de mapas de ligação. Os mapas de ligação são um pré-requisito para estudos de características de herança qualitativas e quantitativas, para a integração das informações moleculares necessárias na seleção assistida por marcadores e mapas baseados em técnicas de clonagem. Desta forma, um recurso fundamental de apoio à genética clássica e à genômica da videira é a construção de um mapa genético denso bem caracterizado e marcadores moleculares gene-específicos (Troggio et al., 2008).

A maioria dos mapas de ligação de videira foi baseada em *loci* genéticos anônimos como SSR e AFLP (Lodhi et al., 1995, Dalbó et al., 2000, Adam-Blondon et al., 2004, Doliquez et al., 2006, Xu et al., 2008). Recentemente, marcadores derivados de análogos de genes de resistência (RGA) foram mapeados (Di Gaspero et al., 2007). Os marcadores baseados em SNP (Polimorfismo de um nucleotídeo único, do inglês, *Single Nucleotide Polimorphism*) constituem a classe mais abundante de polimorfismos, atraindo atenção significativa na criação de mapas genéticos densos. Os marcadores SNPs são úteis na identificação de genes candidatos de interesse para ser associado com locos de características quantitativas (QTLs).

O desenvolvimento de mapas físicos e sua integração com marcadores genéticos são necessários para isolar e clonar eficientemente genes de interesse (Barker et al., 2005, Troggio et al., 2007). Em videira, está disponibilizada bibliotecas de DNA genômico ligados a cromossomos artificiais de bactérias (BAC), principalmente para a cv. *Vitis vinifera* e também para genótipos com genes de resistência à doenças (Adam-Blondon et al., 2005, Lamoureux et al., 2006). Bibliotecas BAC desenvolvidas para outras espécies *Vitis* podem ser usadas como fontes para genes de resistência no melhoramento de videira e no desenvolvimento de mapas físicos (Pauquet et al., 2001).

Dada a sua importância cultural e econômica, a videira foi a primeira espécie entre as frutíferas a ter seu genoma sequenciado. A videira é atrativa para estudos genômicos porque é uma espécie diplóide, com 19 cromossomos. Os genótipos das variedades de videiras são altamente heterozigotos e aproximadamente todas as variedades modernas cultiváveis são hermafroditas, autofecundáveis e facilmente intercruzáveis (This et al., 2006). Dois projetos foram responsáveis pelo sequenciamento do genoma da videira. O primeiro projeto foi constituído por um consórcio público de laboratórios Franco-Italiano (Jaillon et al., 2007). O segundo foi constituído pela colaboração entre o *Instituto Agrario San Michele all'adige* (IASMA) e duas companhias privadas, *Myriad Genetics Incorporated*, e o *454 Life Science* (Velasco et al., 2007). Nesse, o mapa físico do genoma da videira e sua integração com o mapa genético foi reportado para a cv. *Pinot Noir*, a qual é altamente heterozigota. As diferenças encontradas entre *loci* foram tão significativas que os autores chegaram à conclusão, após análise do genoma da videira, de que o mesmo era composto por praticamente dois genomas. (Velasco et al., 2007).

No projeto franco-italiano, a linhagem PN40024, com homozigoze estimada em 93%, e originalmente derivada de *Pinot Noir* permitiu alta qualidade de montagem das sequências obtidas (Jaillon et al., 2007). O projeto IASMA foi também centrado na cv. elite *Pinot Noir*, com os múltiplos objetivos de montagem do genoma, identificação e anotação de genes e identificação da maioria dos possíveis polimorfismos. De especial interesse dos biólogos e melhoristas foram os polimorfismos em regiões codificantes, uma vez que *Pinot Noir* é uma cultivar altamente polimórfica, com dois haplótipos claramente distinguíveis revelando diversos milhões de SNPs e pequenos *Indels* (inserções/deleções). Isto representa uma fonte substancial para programas de melhoramento e associação de características com marcadores e QTLs (Velasco et al., 2007).

As informações de resultados de sequenciamento obtidas dos projetos-genoma forneceram uma organização global sobre o conteúdo de genes e sobre os componentes estruturais do DNA em 19 cromossomos de videira. Um número de 44.179 *contigs* foram fundidos em 2.093 *meta-contigs*, cobrindo 477,1 Mb de DNA genômico. Destes, 435,1 Mb foram ancorados em 19 grupos de ligação (LG) usando 1.356 marcadores. Mais de 80% dos *meta-contigs* ancorados foram orientados por dois ou mais marcadores. O número de genes preditos foi de 29.585, dos quais 96,1% foram atribuídos nos LGs. Um número de 1.751.176 SNPs foram mapeados nos cromossomos e, então, identificados em 86,7% dos genes ancorados (Velasco et al., 2007).

A grande quantidade de dados gerados pelos dois projetos constituirá uma fonte útil para a seleção assistida por marcadores e melhoramento, uma vez que QTLs e características monogênicas são atribuídas em regiões bem definidas. Além disto, os resultados dos trabalhos de sequenciamento genômico permitiram a seleção de genes-candidatos de múltiplas rotas metabólicas visando não só o seu entendimento, mas, também, o melhoramento genético vegetal por diversas metodologias. Assim, plantas mais resistentes a doenças e pragas, mais tolerantes a estresses ambientais, mais produtivas e de melhor qualidade estão sendo geradas a partir da compreensão das bases moleculares que governam a vida vegetal. Como descrito na Introdução da presente Tese, é com este objetivo geral que o presente trabalho pretende contribuir.

7. O TRANSCRITOMA DA VIDEIRA

O início da era genômica trouxe um progresso sem precedentes para o conhecimento da biologia molecular da videira, e uma poderosa ferramenta genética e genômica estão agora disponíveis ou vêm sendo desenvolvidas. Dentre elas, cita-se o mapeamento de populações, o mapeamento físico e genético, uma extensa coleção de ESTs, com 357.856 sequências depositadas no banco de dados de ESTs do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, em 10 de Dezembro de 2009) e diversas ferramentas para a análise da expressão gênica.

Estudos publicados, baseados na análise de ESTs (Ablett et al., 2000, da Silva et al., 2005), em amostragens diferenciais (DD, do inglês, *Differential Display*; Davies & Robinson, 2000) e cDNAs têm permitido mostrar mudanças dramáticas no transcriptoma da videira ocorrendo durante o amadurecimento do fruto. De acordo com

esses estudos foram relatados 740 genes envolvidos no desenvolvimento do fruto, principalmente envolvidos em mecanismos de defesa, resposta ao estresse, metabolismo primário e secundário, crescimento do fruto e metabolismo hormonal. Grimplet et al. (2007) publicaram uma longa descrição dessas classes funcionais de genes, e os resultados obtidos permitiram revelar novos padrões de expressão tecido-específica de um grande repertório de genes expressos em tecidos do fruto. Em outro trabalho, desenvolvido por Pilati et al. (2007), foi descrita a análise da expressão gênica de frutos em desenvolvimento de videira. Esse trabalho demonstrou a ocorrência de duas fases distintas de expressão gênica ao longo do processo de desenvolvimento. A fase *pré-véraison* representa um estágio de reprogramação do metabolismo celular, caracterizado pela expressão de numerosos genes envolvidos na sinalização hormonal e na regulação transcricional. A fase *pós-véraison* é caracterizada pelo início de um metabolismo especializado em amadurecimento, responsável pelas características fenotípicas do fruto maduro. Entre as duas fases, em plena *véraison*, uma explosão oxidativa e uma modulação concomitante de uma rede enzimática antioxidante foram observadas. De acordo com os autores, isto pode representar novos recursos para dissecar os mecanismos de controle de amadurecimento do fruto em plantas não climatéricas (Pilati et al., 2007).

Com o objetivo de entender a rede transcricional responsável pelo controle do desenvolvimento do fruto, um trabalho de análise da expressão gênica foi conduzido por Deluc et al. (2007), utilizando cDNAs derivados de diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos de *Cabernet Sauvignon* e a hibridização destes com oligonucleotídeos imobilizados em um *GeneChip*. Como resultado foram determinados os padrões da expressão de genes que têm papel funcional-chave em respostas a biossíntese de fitormônios, sequestro de cálcio, transporte e sinalização, metabolismo da parede celular mediadora de expansão, amadurecimento, amolecimento, metabolismo e transporte de flavonóides, metabolismo de ácidos orgânicos e aminoácidos, ciclo circadiano e resistência à patógeno. Em particular, o padrão de expressão dos mRNAs de fatores de transcrição, associados à biossíntese de ABA e genes de sinalização de cálcio foram identificados como candidatos associados a processos de particionamento de auxinas dentro de células do fruto, à produção de compostos aromáticos e à regulação de rotas e sequestro de compostos flavonóides. Estes resultados representam a primeira análise de alta resolução da dinâmica do transcrito que ocorre durante sete estádios do desenvolvimento dos frutos da videira (Deluc et al., 2007).

O tamanho da baga, o qual determina a produtividade em videiras, e a apirenia, a qual é especialmente procurada em uvas de mesa e que é negativamente correlacionada com o tamanho do fruto, são características de processos complexos de desenvolvimento, modificados por fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Com o objetivo de elucidar geneticamente tais características, Costantini et al. (2008) realizaram análise quantitativa em 163 indivíduos de uma progênie F₁ obtidos de um cruzamento de duas cultivares de uva de mesa (*Itália*, com sementes e *Big Perlon*, sem sementes). Três principais QTLs nos LGs 2, 6 e 16 foram encontrados e associados ao controle de características de tempo de maturação. O QTL de maior efeito no fenótipo foi detectado no LG 18, associado ao tamanho dos frutos e ao conteúdo das sementes e, portanto, potencialmente associado com a apirenia.

Em videira, 2.004 genes foram identificados como fatores de transcrição, o que representa 6,7% do genoma, semelhante ao de 6% para *A. thaliana*, 4,8% para *O. sativa* e 6% para *Populus*. Sessenta e duas famílias de genes de fatores de transcrição foram encontradas, um número muito semelhante ao de 64 de *A. thaliana*, 62 de *O. sativa* e 63 de *Populus*. As famílias de fatores de transcrição como MYB (desempenham um papel no controle de acúmulo de metabólitos secundários na baga da videira), AP2/EREBP (contribuem para a resposta de defesa da planta), bHLH MADS-box (fenômenos relacionados à regulação do florescimento), incluem um grande número de membros (Velasco et al., 2007).

Alguns fatores de transcrição como WAKY, NAC e AP2/EREBP, envolvidos em diferentes funções no controle da expressão gênica, são um exemplo típico de fatores específicos de plantas (Yanagisawa, 1999). Uma família de proteínas Dof (*DNA binding with one finger*) exclusiva de plantas é caracterizada por um segmento de 52 aminoácidos conservados, abrangendo um único dedo de zinco CX₂CX₂₁CX₂C (Yanagisawa, 1995, Zhang et al., 1995, De Paolis et al., 1996, Vicente-Carbajosa et al., 1997, Mena et al., 1998). Em contrapartida, suas sequências divergem fora do domínio Dof. Estas características sugerem que as proteínas Dof estão envolvidas na regulação de diferentes funções típicas e de relevância geral para as plantas.

A identificação de domínios de proteínas Dof associada à expressão de diversos genes, sugere muitas funções fisiológicas. Tais funções incluem a regulação da expressão dos genes relacionados com a assimilação de carbono (Yanagisawa & Sheen 1998), sinalização do fitocromo (Park et al., 2003, Ward et al., 2005), maturação e germinação das sementes (Vicente-Carbajosa et al., 1997, Mena et al., 1998, Gualberti

et al., 2002, Washio, 2003), a resposta à auxina (Baumann et al., 1999), a resposta ao ácido salicílico (Kang et al., 2003) e da função das células-guarda dos estômatos (Plesch et al., 2001). Recentemente, Imaizumi et al. (2005) e Skirycz et al. (2006) também relataram o envolvimento de fatores de transcrição Dof em fotoperíodo de floração e síntese de glucosinolatos (um grupo de metabolismo secundário), respectivamente.

Fatores de transcrição da família Dof foram identificados em uma variedade de angiospermas, incluindo *A. thaliana*, milho, arroz, soja, trigo e cevada (revisado em Yanagisawa, 2002, Yanagisawa, 2004). Os resultados de sequenciamento do genoma de arroz e *A. thaliana* revelaram a existência de 37 genes *Dof*, incluindo um pseudogene em *A. thaliana* (Yanagisawa, 2002) e 30 genes *Dof* em arroz (Lijavetzky et al., 2003).

A abordagem filogenética de uma coleção completa de fatores de transcrição Dof em *A. thaliana* e arroz, utilizada por Lijavetzky et al. (2003), permitiu a classificação de genes ortólogos em quatro grandes grupos ou subfamílias e evidenciou a perda de genes e eventos de duplicação que ocorreram antes e depois do último ancestral comum das duas espécies.

O domínio Dof foi inicialmente identificado como um domínio de ligação ao DNA. Atualmente é considerado como um domínio bifuncional para ligação ao DNA e de interações proteína-proteína. A primeira interação proteína-proteína foi encontrada em um domínio de uma proteína Dof de *A. thaliana* (OBP1), a qual foi identificada como uma proteína interagindo com proteínas bZip associadas à respostas a estresses. Outro exemplo de interação Dof-bZip foi demonstrado em um domínio da proteína Dof de milho (PBF) e uma proteína bZip e chamado de OPAQUE2/02 (Yanagisawa, 2004).

O conhecimento sobre o domínio de proteínas Dof de plantas aumentou significativamente nos últimos 10 anos e os resultados obtidos sugerem o seu envolvimento em muitas regulações biológicas. O alto grau de conservação do domínio Dof e a diversidade da porção restante da proteína fornecem materiais ricos para o estudo da diversificação genética. No presente trabalho, buscou-se realizar um estudo filogenético, empregando o conjunto completo de genes *Dof* de três eudicotiledôneas cujos genomas foram completamente sequenciados (*Vitis*, *Arabidopsis* e *Populus*). Este estudo buscou a identificação de genes ortólogos nas três espécies. Paralelamente, os perfis de expressão de 26 genes *Dof* de videira foram estudados por RT-qPCR em nove órgãos no período vegetativo e reprodutivo. A combinação do estudo das relações filogenéticas com dados funcionais é fundamental para estabelecer efetivamente a

conservação e divergência da família de genes *Dof* na videira e em outras espécies de plantas.

Após uma ampla revisão bibliográfica a respeito do desenvolvimento inicial do fruto da videira de uma cultivar apirênica, serão apresentados os principais resultados obtidos após subtração por BRAT. No capítulo seguinte são abordados os resultados de sequenciamento de cDNAs de três bibliotecas fruto-específica. E em seguida, uma análise filogenética molecular de um gene candidato obtido pela abordagem BRAT está detalhada. Finalmente uma discussão geral abordando os dois temas está apresentada no Capítulo IV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ablett E, Seaton G, Scott K, Shelton D, Graham MW, Baverstock P, Lee LS, Henry R (2000) Analysis of grape ESTs: global gene expression patterns in leaf and berry. *Plant Sci.* 159:87-95
- Adam-Blondon AF, Lahogue-Esnault F, Bouquet A, Boursiquot JM, This P (2001) Usefulness of two SCAR markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivars. *Vitis* 40 3: 147-155
- Adam-Blondon AF, Roux C, Claux D, Butterlin G, Merdinoglu D, Chalhoub B, This P (2004) Mapping 254 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: A tool for grape genetics. *Theor. Appl. Genet.* 109:1017-1027
- Adam-Blondon AF, Bernole A, Faes G, Lamoureux D, Pateyron S, Grando MS, Caboche M, Velasco R, Chalhoub B (2005) Construction and characterization of BAC libraries from major grapevine cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 110:1363:1371
- Aguero C, Vigliocco A, Abdala G, Tizio R (2000) Effect of gibberellic acid and uniconazol on embryo abortion in the stenospermocarpic grape cultivars Emperatriz and Perlon. *Plant Growth Regul.* 30: 9-16
- Aldini G, Carini M, Piccoli A, Rossoni G, Facino RM (2003) Procyanins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci.* 73: 2883-2898
- Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, Vinson JA (2003) Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat. Res.* 523-524: 87-97
- Barker CL, Donald T, Pauquet J, Ratnaparkhe MB, Bouquet A, Adam-Blondon AF, Thomas MR, Dry I (2005) Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theor. Appl. Genet.* 111: 370-377
- Baumann K, De Paolis A, Costantino P, Gualberti G (1999) The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants. *Plant Cell* 11: 323-333
- Blouin J, Guimberteau G (2000) *Maturation et Maturité des Raisins*, Féret, Bordeaux, France, 151 pp
- Boss PK, Davies C (2001) Molecular biology of sugar and anthocyanin accumulation in grape berries. In: Roubelakis-Angelakis KA (Eds) *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 1-33

Boss PK, Davies C, Robinson SP (1996) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* 4: 1059-1066

Boss PK, Thomas MR (2002) Association of dwarfism and floral induction with grape 'green evolution' mutation. *Nature* 416: 847-850

Bouquet A, Danglot Y (1996) Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Vitis* 35 1: 35-42

Camargo UA, Amaral AL, Oliveira PRD (1999) Uva sem sementes: uso da biotecnologia na busca de novas cultivares apirênicas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília*, 2:108-112

Camargo UA, Mashima CH, Czermainski ABC (1997) Avaliação de cultivares de uvas apirênicas no Vale do São Francisco. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 8p. (EMBRAPA-CNPUV. Comunicado Técnico, 26)

Camargo UA, Nachtigal JC, Maia JDG, Oliveira PRD, Protas JFS (2003a) BRS Clara: nova cultivar de uva branca de mesa sem semente. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho

Camargo UA, Nachtigal JC, Maia JDG, Oliveira PRD, Protas JFS (2003b) BRS Linda: nova cultivar de uva branca de mesa sem semente. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho

Camargo UA, Nachtigal JC, Maia JDG, Oliveira PRD, Protas JFS (2003c) BRS Morena: nova cultivar de uva preta de mesa sem semente. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho

Conde C, Silva P, Fontes N, Dias ACP, Tavares RM, Souza MJ, Agasse A, Delrot S, Géros H (2007) Biochemical Changes throughout grape Berry development and fruit and wine quality. *Food* 1: 1-22

Coombe BG (1992) Research on development and ripening of the grape berry. *Am. J. Enol. Viticult.* 1:101-110

Coombe BG, Hale CR (1973) Hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiol.* 51: 629-634

Costantini L, Battilana J, Lamaj F, Fanizza G, Grando MS (2008) Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): From quantitative trait loci to underlying BAC DNA library. *BMC Plant Biol.* 8:28

Cronquist A (1981) An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University, 1262p

da Silva FG, Iandolino A, Al-Kayal F, Bohlmann MC, Cushman MA, Lim H, Ergul A, Figueroa R, Kabuloglu EK, Osborne C, Rowe J, Tattersall E, Leslie A, Xu J, Baek J, Cramer GR, Cushman JC, Cook DR (2005) Characterizing the grape transcriptome.

Analysis of expressed sequence tags from multiple *Vitis* species and development of a compendium of gene expression during berry development. *Plant Physiol.* 139:574-597

Dalbò MA, Ye GN, Weeden NF, Steinkellner H, Sefc KM, Reisch BI (2000) Gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome* 43:333-340

Dangl GS, Mendum ML, Prins BH, Walker MA, Meredith CP, Simon CJ (2001) Simple sequence repeat analysis of a clonally propagated species: a tool for managing a grape germplasm collection. *Genome* 44: 432-438

Davies C, Boss PK, Robinson SP (1997) Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiol.* 115: 1155-1161

Davies C, Robinson SP (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol.* 122:803-812

Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, Tillett RL, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC, Cramer GR (2007) Transcriptomic and metabolite analysis of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* 8:429

De Paolis A, Sabatini S, De Pascalis L, Costantino P, Capone I (1996) A rolB regulatory factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins. *Plant J.* 10: 215-223

Doliguez A, Adam-Blondon AF, Cipriani G, Di Gaspero G, Laucou V, Merdinoglu D, Meredith C, Riaz S, Roux C, This P (2006) An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theor. Appl. Genet.* 113:369-382

FAO (2007) <http://faostat.fao.org>

Ferguson LR (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* 475: 89-111

Galet P (1993) *Précis de viticulture*. 6th ed. Paris: Imprimerie Déhan, 582p

Giovannoni J (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu Rev Plant Phys* 52: 725-749

Giovannoni J (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16: S170-S180

Grimplet J, Deluc LG, Tillett RL, Wheatley MD, Schlauch KA, Cramer GR, Cushman JC (2007) Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics* 8:187

Gualberti G, Papi M, Bellucci L, Ricci I, Bouchez D, Camilleri C, Costantino P and Vittorioso P. (2002) Mutations in the Dof Zinc Finger Genes DAG2 and DAG1

Influence with Opposite Effects the Germination of *Arabidopsis thaliana* Seeds. Plant Cell 14: 1253-1263

Hanania U, Velcheya M, Or E, Flaishman M, Sahar N, Perl A (2007) Silencing of chaperonin 21, that was differentially expressed in inflorescence of seedless and seeded grapes, promoted seed abortion in tobacco and tomato fruits. Transgenic Res. 16:515-525

Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA, Kay SA (2005) FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis thaliana*. Science 309: 293-297

Jaillon O, Aury Jm, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Huguency P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pè Me, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon A-F, Weissenbach J, Quétier F, Wincker P (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature 449:463-467

Jiang Y, Joyce DC (2003) ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. Plant Growth Regul. 39: 171-174

Kang HG, Singh KB (2000) Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis thaliana* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. Plant J. 21: 329-339

Kennedy JA, Hayasaka Y, Vidal S, Waters EJ, Jones GP (2001) Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. J. Agr. Food Chem. 49: 5348-5355

Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL (2000a) Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. Phytochemistry 55: 77-85

Kennedy JA, Troup GJ, Pilbrow JR, Hutton DR, Hewitt D, Hunter CR, Ristic R, Iland PG, Jones GP (2000b) Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. Aust. J. Grape Wine Research 6: 244-254

Kishino AY, Carvalho SLC, Roberto SR (2007) Viticultura Tropical: o sistema de produção do Paraná. Londrina: IAPAR, 366p

Lahogue F, This P, Bouquet A (1998) Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. Theor. Appl. Genet. 97 (5-6): 950-959

Lamoureux D, Bernole A, Le Clainche I, Tual S, Thareau V, Paillard S, Legeai F, Dossat C, Wincker P, Oswald M, Merdinoglu D, Vignault C, Delrot S, Caboche M, Chalhoub B, Adam-Blondon A-F (2006) Anchoring of a large set of markers onto a

BAC library for the development of a draft physical map of the grapevine genome. *Theor. Appl. Genet.* 113:344-356

Leão PCD (2001) Principais cultivares de uvas finas de mesa. In: LEÃO, P.C.deS. (Ed.) Uva de mesa - Produção: Aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 128p. (Frutas do Brasil; 13)

Lijavetzky D, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J (2003) Genome wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis thaliana* Dof gene families. *BMC Evol. Biol.* 3: 17

Lodhi MA, Daly MJ, Ye GN, Weeden NF, Reisch Bi (1995) A molecular marker based linkage map of *Vitis*. *Genome* 38:786-794

Loomis NH, and Weinberger JH (1979) Inheritance studies of seedlessness in grape. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104:181-184

Manica I, Pommer CV (2006) Uva: do plantio a produção, pós-colheita e mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, 185p

Mashima CH (2000) Uva sem semente. Recife, PE: SEBRAE/PE, *Série Agricultura*, 14. 51p

Mailhac N, Chervin C (2006) Ethylene and grape berry ripening. *Stewart Postharvest Review* 2: 1-5

Mello LMR (2002a) Produção e Comercialização de Uvas e Vinhos - Panorama 2002. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/artigos.html>, Acessado em 10/12/2009

Mello LMR (2002b) Atuação do Brasil no Mercado Internacional de Uvas e Vinhos - Panorama 2002. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/artigos.html>, Acessado em 10/12/2009

Mello LMR (2007) Viticultura Brasileira: Panorama 2007. Disponível em http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama2007_vitivinicultura.pdf, Acessado em 10/12/2009

Mena M, Vicente-Carbajosa J, Schmidt R, Carbonero P (1998) An endosperm-specific Dof protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm. *Plant J.* 16: 53-62

Mullins MG Bouquet A, Williams LE (1992) *Biology of grapevine*. Cambridge, Grã-Bretanha: Cambridge University Press, 239p

Ollat N, Diakou-Verdin P, Carde JP, Barrieu F, Gaudillere JP, Moing A (2002) Grape berry development: A review. *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin* 36 3: 109-131

Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B (2001) Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant J.* 28: 455-464

Park DH, Lim PO, Kim JS, Cho DS, Hong SH, Nam HG (2003) The *Arabidopsis thaliana* COG1 gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *Plant J.* 34: 161-171

Pastorian K, Hawel L, Byus CV (2000) Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal. Biochem.* 283 1: 89-98

Pauquet J, Bouquet A, This P, Adam-Blondon AF (2001) Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment on their usefulness for marker assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 103:1201-1210

Pratt C (1971) Reproductive anatomy in cultivated grapes. a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 22: 92-109

Protas JFS, Camargo UA, Mello LMR (2003) A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>, Acessado em: 10/12/2009

Pommer, CV (2003) Uva: tecnologia de produção, pós-colheita. Porto Alegre: Cinco Continentes, 777p

Possner DRE, Kliewer WM (1985) The localization of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* 24: 229-240

Pirie A, Mullins MG (1976) Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate, and abscisic acid. *Plant Physiol.* 58: 468-472

Pilati S, Perazzolli M, Malossini A, Cestaro A, Demattè L, Fontana P, Dal Rì A, Viola R, Velasco R, Moser C (2007) Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at *véraison*. *BMC Genomics* 8:428

Raven PR, Evert RF, Eichhorn SE (2001) *Biologia Vegetal*, 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 906p

Revers LF, Lampe VS, Oliveira PRD, Camargo UA, Lima JC (2006) Uso de marcadores moleculares para seleção assistida no melhoramento de uvas de mesa apirênicas. *Rev. Bras. Frut.* 28:104-108

Romeyer FM, Macheix JJ, Goiffon JP, Reminiac CC, Sapis JC (1983) The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *J. Agric Food Chem.* 31: 346-349

Skirycz A, Reichelt M, Burow M, Birkemeyer C, Rolcik J, Kopka J, Zanon MI, Gershenzon J, Strnad M, Szopa J, Mueller-Roeber B, Witt I (2006) Dof transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 47 10-24

Spiller GA, Story JA, Furumoto EJ, Chezem JC, Spiller M (2003) Effect of tartaric acid and dietary fibre from sun-dried raisins on colonic function and on bile acid and volatile fatty acid excretion in healthy adults. *Br. J. Nutr.* 90: 803-8007

Stout AB (1936) Seedlessness in grapes. New York Agriculture Experimental Station Technology Bulletin, New York, 238 33:1-65

Taiz L, Zeiger E (2006) *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed

This P, Lacombe T, Thomas MR (2006) Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet.* 22: 511-519

Troggio M, Malacarne G, Coppola G, Segala C, Cartwright Da, Pindo M, Stefanini M, Mank R, Moroldo M, Morgante M, Grando Ms, Velasco R (2007) A dense single-nucleotide-polymorphism-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.) anchoring Pinot Noir bacterial artificial chromosome contigs. *Genetics* 176:2637-2650

Troggio M, Malacarne G, Vezzulli S, Salmaso M, Faes G, Velasco R (2008) Comparison of different methods for SNP detection in grapevine. *Vitis* 47:21-30

Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P (2000) Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends Biotechnol.* 18 6: 233-242

Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE*, 2:e1326

Vicente-Carbajosa J, Moose SP, Parsons RL, Schmidt RJ (1997) A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 7685-7690

Zhang B, Chen W, Foley R, Büttner M, Singh K (1995) Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences. *Plant Cell* 7: 2241-2252

Yanagisawa S. (1995) A novel DNA binding domain that may form a single zinc finger motif. *Nucleic Acids Res.* 23: 3403-3410

Yanagisawa S. (2000) Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J.* 21: 28-288

Yanagisawa S. (2002) The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 7: 555-560

Yanagisawa S. (2004) Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant Cell Physiol.* 45: 386–391

Yanagisawa S, Sheen J (1998) Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell* 10: 75-89

Xu K, Riaz S, Roncoroni NC, Jin Y, Hu R, Zhou R, Walker MA (2008) Genetic and QTL analysis of resistance to *Xiphinema index* in a grapevine cross. *Theor. Appl. Genet.* 116:305-311

Ward JM, Cufu CA, Denzel MA, Neff MM (2005) The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17: 475-485

Washio K (2001) Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-expression of a peptidase gene following the germination of rice grains. *Biochim. Biophys. Acta* 1520: 54-62

CAPÍTULO II

**Capítulo II. IDENTIFICATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF GENES
ASSOCIATED WITH THE EARLY BERRY DEVELOPMENT IN THE
SEEDLESS GRAPE (*VITIS VINIFERA* L.) CULTIVAR SULTANINE**

Manuscrito submetido à revista *Plant Cell Reports*

Identification and expression analysis of genes associated with the early berry development in the seedless grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar Sultanine

Danielle Costenaro da Silva, João Antônio Pêgas Henriques, Rogério Margis, Giancarlo Pasquali, Luís Fernando Revers.

Danielle Costenaro da Silva, João AP Henriques, Rogério Margis, Giancarlo Pasquali, Luís F Revers

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Danielle Costenaro da Silva

Laboratório Nacional Agropecuário, LANAGRO, Porto Alegre, RS, Brasil.

Luís F Revers

Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, Brasil.

Phone: +55 54 3455-8039

Fax +55 54 3451-2792

E-mail address: luis@cnpuv.embrapa.br

Abstract

Sultanina grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the most important commercial seedless table-grape varieties around the world. It has been the main source of seedlessness in table-grape breeding programs. Despite its commercial relevance, little is known about the genetic control of seedlessness in grapes, remaining unknown the molecular identity of key genes responsible for such phenotype. In an attempt to identify genes putatively associated with berry development in Sultanina grapevine, we developed an RDA (Representational Difference Analysis) modified method named Bulk Representational Analysis of Transcripts (BRAT). A total of 2,500 transcript-derived fragments (TDFs)

were identified and cloned by RDA according to three specific developmental berry stages. After sequencing and *in silico* analysis, 1,554 (62.2%) TDFs were validated according to our sequence quality cut-off. The assembly of these ESTs yielded 716 singletons and 69 clusters, with an overall EST redundancy of approximately 76%. Amongst all stage-specific cDNAs, nine candidate genes were selected and, along with two reference-genes, submitted to a deeper analysis of their temporal expression profiles by RT-qPCR. Among them, seven genes proved to be in agreement with the stage-specific expression that allowed their isolation by RDA.

Keywords

Vitis vinifera, grapevine, Sultanina, seedlessness, berry development, gene expression

Abbreviations

BBCH - Basf, Bayer, Ciba-Geigy and Hoechst

BRAT - Bulk Representational Analysis of Transcripts

Cv - Cultivar

DDD - Differential Digital Display

DP - Differential Product

DS - Developmental Stages

ESTs - Expressed Sequence Tags

RDA - Representational Difference Analysis

RT-qPCR - Reverse transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction

SdI - Seed development Inhibitor

TDFs - Transcript-derived Fragments

Introduction

Larger fruit size, higher fruit number per plant, better nutritional quality and reduced seed number and size are the major goals in the genetic improvement of fruit crop species. Considering table-grapes (*Vitis vinifera* L.), seedlessness is one of the most appreciated quality traits. The interest in understanding of genetic and molecular mechanisms driving seedlessness in table-grapes is justified by their economic relevance and most breeding programs have focused on the generation of new cultivars (cv.) combining seedlessness with other quality traits such as larger berry size, muscat flavor or crispiness (Loomis and Weinberger 1979; Bouquet and Danglot 1996; Costantini et al. 2008). Sultanina is the world most important commercial table-grape

variety and it has been the main source of seedlessness in table-grape breeding programs (Adam-Blondon et al. 2001).

Since the pioneer work of Stout (1936), two different types of seedlessness mechanisms have been observed among grape genetic resources: parthenocarpy (like in cv. Corinto) and stenospermocarpy (like in cv. Sultanina, also known as Thompson Seedless, Sultanine or White Kishmish). Parthenocarpy, or fruit development in the absence of pollination, yields small berries that completely lack seeds, employed mainly for the production of seedless raisins. In stenospermocarpic varieties, pollination and fertilization occur normally, but the embryo and/or the endosperm abort three to six weeks after fertilization. As a result, seed development ceases, leaving only partially formed seeds or seed traces, while the ovary wall pericarp continues to grow to originate berries with sizes compatible with commercial requirements for fresh fruit consumption (Ledbetter and Ramming 1989).

Different hypothesis have been proposed for the genetic control of seedlessness. The predominant hypothesis suggests the involvement of three independent and complementary recessive genes regulated by a dominant gene (Bouquet and Danglot 1996), later named Seed development Inhibitor or *SdI*, which inhibits seed development (Lahogue et al. 1998). Nevertheless the molecular identity of such key gene remains unknown. In order to better locate it, a quantitative genetic analysis of better size and seedlessness in an F₁ segregating population derived from the cross between a classical seeded (cv. Dominga) and a newly bred seedless (cv. Autumn) table-grapes showed the usefulness of an LG18 microsatellite locus, named VMC7F2, as a marker potentially linked to seedlessness in table-grapes (Cabezas et al. 2006; Mejía et al. 2007). More recently, differential gene expression analysis between seeded and seedless lines of cv. Sultanina allowed the identification of a gene coding for the chloroplast chaperonin 21 (ch-Cpn21), whose silencing in tobacco and tomato fruits resulted in seed abortion (Hanania et al. 2007). The authors therefore concluded that the ch-Cpn21 protein is essential for seed development and its silencing may be involved in seed abortion in stenospermocarpic grapes. Clearly, ch-Cpn21 is a strong candidate as key gene in the control of seedlessness in grapes. A suggestible final proof for such or any candidate gene would be the phenotype complementation of Sultanina grape or other seedless varieties.

In grapevine, an undesired negative correlation exists between seedlessness and berry size since seeds yield important hormones for fruit development (Boss et al.

2002). However additional or even independent mechanisms could be involved in the regulation of berry size (Ben-Tal 1990; Fanizza et al. 2005; Costantini et al. 2008). For instance, the monogenic fleshless berry (*flb*) mutation in cv. Ugni Blanc impairs the differentiation and division of most vacuolated cells in the inner mesocarp that forms the berry flesh early after fertilization, resulting in a 10-fold reduction in fruit weight (Fernandez et al. 2006). It seems that the defect is not simply a deficiency in plant growth regulator levels and does not show any obvious relationship with fertility, seed size or number.

In grapevine, like in many other plants, it seems that flowering is regulated by the gibberellin:cytokinin balance. Gibberellins inhibit inflorescence and promote tendril development (Boss and Thomas et al. 2006), while cytokinins exert some of their effects by inducing the production of inflorescences from tendril meristems (Srinivasan and Mullins 1978). Gibberellins are likely to take a prominent part in seedlessness (Kimura et al. 1996; Ledbetter and Shonnard 1990; Bouquet and Danglot 1996) possibly in association with other growth regulating substances like auxins (Weaver 1953) or ethylene (Nitsch et al. 1960). Treatment with gibberellins, besides delaying ripening, is effective in the promotion of seedlessness in seeded grapes, in the suppression of vestigial seed development in normally seedless grapes, in the increase of berry and cluster size and in the decrease of cluster compactness (Ben-Tal 1990; Reynolds et al. 2006).

In the current work, a strategy based on Representational Difference Analysis (RDA – Pastorian et al. 2000) was used in order to identify moderately rare to very rare cDNAs associated with grape berry development in stenospermocarpic Sultanina grape. As the main result of this strategy, nine candidate genes were selected and analyzed for their temporal transcriptional profile by RT-qPCR. The results gathered on these genes are discussed in the light of previous reports and suggest that they may play key roles during seedless berry development.

Materials and Methods

Plant material and RNA extraction

Grape berries from *Vitis vinifera* L. cv. Sultanina were collected from November 2004 until January 2005 (2004/2005) harvest in open vineyards grown at Embrapa Uva e

Vinho (Bento Gonçalves, RS, Brazil). Samples were collected at fruit set (DS0) and at developmental stages (DS) of 2, 4, 6 and 8 weeks after DS0 (Figure 1B) in the morning hours from at least 12 independent plants, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until RNA extraction. Three distinct moments of berry fruit development were chosen to perform the representational difference analysis (as described below): fruit set (DS0 – BBCH code # 71), characterized as the first stage of fruit development when young fruits begin to swell and flower remains are lost; four-weeks after DS0 (DS4 – BBCH growth stage scale # 75), when berries reach the size of peas and clusters are already hanging; and eight-weeks after DS0 (DS8 – BBCH growth stage scale # 81), characterized by the beginning of ripening, when berries begin to develop variety-specific color. For RT-qPCR validation, we included other two stages of grape berry development: two-weeks after DS0 (DS2 – BBCH growth stage scale # 73), characterized by berries in pepper-corn size and clusters starting to hang; and six-weeks after DS0 (DS6 – BBCH growth stage scale # 77), when berries begin to touch each other. The berry growth stages were followed according to the Extended BBCH growth stage scale as reviewed by Lorenz et al (1995). Total RNA was extracted with Purelink RNA Reagent (Invitrogen Life Technologies) and the miniprep protocol recommended by the manufacturer. RNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis and spectrophotometry.

Full length cDNA synthesis

Complementary DNA was prepared using the SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech Laboratories), according to the manufacturer's instructions, in the presence of RNase OUT (Invitrogen Life Technologies). First-strand cDNA synthesis was performed with the Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies) using 1 µg of total RNA as template. First-strand cDNA (2 µL) was used as template to synthesize the second strand of cDNA. All RNA preparations were treated with DNase I (Fermentas) to eliminate residual DNA contamination.

Bulk Representational Analysis of Transcripts (BRAT)

Representational Difference Analysis (RDA) was performed with total RNAs from the sampled stages of grape fruit development identified by DS0, DS4 and DS8, as optimized by Pastorian et al. (2000). Approximately 2 µg of double-stranded cDNA were digested with the restriction enzyme MboI (New England Biolabs). Resulting

products were purified using the GFX Kit (GE Healthcare) and ligated to adapters Rbam12 (GATCCTCGGTGA) and Rbam24 (AGCACTCTCCAGCCTCTCTCACCGAG). To provide sufficient amounts of starting material for RDA, cDNAs were diluted and amplified using the RBAM24 as primer (25 cycles of denaturing at 95 °C for 45 s and annealing and extension at 70 °C for 3 min). All the remaining rounds of hybridization used aliquots derived from the same driver cDNA synthesis reaction. The final PCR products were purified using the GFX Kit, resulting in the driver cDNA populations. To generate tester cDNA populations, a small aliquot of the drivers was completely digested with MboI to remove the 24mer primers that were incorporated into the cDNA by PCR. After purification by GFX, the resulting products were ligated to different 24mer adapters, Nbam12 (GATCCTCCCTCG) and Nbam24 (AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG). In order to isolate genes up-regulated in DS0, we used cDNAs from DS4 and DS8 (bulked) as driver and DS0 cDNAs as tester. In order to isolate genes up-regulated in DS4, we used cDNAs from DS0 and DS8 (bulked) as driver and DS4 cDNAs as tester and, finally, to isolate genes up-regulated in DS8, we used cDNAs from DS0 and DS4 (bulked) as driver and DS8 cDNAs as tester. To perform the first round of hybridization and amplification, generating the first differential product (DP1), driver and tester populations were mixed in the ratio of 50:1 in a 5 µL reaction at 67 °C for 24 h, and amplified by PCR with the NBam24 primer (7 cycles at 95 °C for 45 s and 70 °C for 3 min). PCR products were diluted and submitted to a new round of amplification to remove unwanted single-stranded cDNAs. After purification, DP1 products were digested with MboI to remove the NBam adapters before ligation to JBam12 (GATCCGTTCATG) and Jbam24 (ACCGACGTCGACTATCCATGAACG) adapters. The second hybridization was performed at a ratio of 100:1. The second differential product (DP2) was obtained using the same procedure as for DP1, using JBam24 as primer instead of NBam24.

Cloning and sequence analysis

One hundred ng of the final RDA products (DP1 and DP2 fragments) were cloned into pGem T-easy (Promega). *Escherichia coli* DH10B competent cells were transformed with the ligated products. Individual bacterial clones were grown in 96-deep-well plates. Plasmid DNA was prepared from 2,500 selected clones and samples were sequenced (Biotechnology Center, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using the automatic sequencer ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Resulting cDNA

sequences (without vector sequences) were then matched using the SisGen (Automatized System of Sequence Analysis; <http://genoma.embrapa.br/genoma/>), a unified tool that dynamically integrates data from various databases including *Vitis vinifera* Genome, *Vitis vinifera* Peptide, *Vitis vinifera* mRNA, Vitis TIGR Clusters, *Arabidopsis thaliana* proteins from MIPS, SwissProt, Go, Non Redundant Database, NCBI and EST Database. Sequence redundancy (R) was calculated according with the quantity of transcripts generated and the size (number of bases) that were added in mounting: $R = 1 - (c + s / i)$, where “c” refers to the number of contigs, “s” refers to the number of singletons, and “i” is the number of ESTs in each input. The novelty of sequences refers to percentage of sequences of each input not yet represented in clusters or singletons already submitted. Singleton and cluster consensual sequences were submitted and are available at the GenBank under accession numbers from GR389936 to GR390695.

RT-qPCR validation

Reverse transcription was performed with one µg of total RNA from each sample using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) according to the manufacturer’s instructions. Design of oligonucleotides was performed with Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) with the criteria to amplify PCR products from 100 to 250 bp (Table 1). PCRs were performed with 10 µL out of 1/100 dilutions of single-stranded cDNAs, using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) with a 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) apparatus. Actin (*VvACT*) and α-tubulin (*VvTUB*; Reid et al. 2006) gene sequences were used as internal controls to normalize the amount of mRNA present in each sample, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method described by Livak and Schmittgen (2001).

Results and Discussion

Identification of differentially expressed genes during the early berry development in Sultanina grape

In order to identify genes differentially expressed during the early developmental stages of Sultanina grape berries, we designed and employed a modified strategy for the

construction of subtracted libraries. Basically, the RDA method was performed as described by Hubank and Schatz (1994) and optimized by Pastorian et al. (2000) with modifications. During the harvest season (2004/2005), fruits from the same clonal plants were collected in five Developmental Stages (DS) as indicated in Figure 1A e 1B. Total RNA berries at DS0, DS4 and DS8 were purified and pooled in three ways for the production of three distinct subtracted libraries according to Figure 1C. Similar cDNA quantities from DS4 and DS8 were pooled as “drivers” to subtract the DS0 “tester” cDNA population, producing the first subtracted library (L1). Likewise, DS0 and DS8 cDNAs were pooled to subtract DS4 tester cDNAs to produce L2 and, finally, L3 was obtained by the subtraction of DS8 tester cDNAs with the equivalent pool of DS0 and DS4 driver cDNAs.

Although DS2 and DS6 were not employed for the construction of subtracted libraries, RNAs from all stages were later employed for the validation of selected candidate genes by RT-qPCR. Such strategy allowed us to minimize costs, time and yielded consistent results concerning differentially expressed genes. We named this RDA strategy as Bulk Representational Analysis of Transcripts, or BRAT (Figure 1C).

A smear of cDNA products was clearly observed in the starting material and after the first BRAT subtraction. After two cycles of RDA, using different tester and driver ratios, a different pattern was evident, especially in the Differential Product 2 (DP2; Figure 2). The resulting BRAT fragments with lengths ranging from 100 to 500 bp were purified and cloned into pGEM-T Easy and a total of 2,500 clones were sequenced and analyzed (Table 2). The number of valid ESTs from the DS0-, DS4- and DS8-enriched libraries passing sequence quality cut-off was 1,554 (62.2%). The assembly of these ESTs yielded 716 singletons and 69 clusters, with an overall EST redundancy of 76%. To better illustrate the distribution of ESTs amongst developmental berry stages of cv. Sultanina, we used a differential digital display (DDD) method (Murray et al. 2007) to construct a diagram of Venn (Figure 3). In accordance with the designed strategy, most clusters/singletons were specific to only one developmental stage, as indicated in Figure 3. Throughout the present technical strategies we were able to identify 86 genes from the seedless grapevine cv. Sultanina that are specific to the fruit-set (DS0) stage of berry development and, respectively, 75 and 232 genes whose expressions are specific to the developmental stages known as four- and eight-weeks after DS0.

Amongst the 785 ESTs (unigene) in the resulting BRAT analysis, we elected nine genes from the most populated clusters or based on their predicted function or involvement in fruit development (Table 3). All these genes were further analyzed by RT-qPCR in order to validate the results obtained by the BRAT method.

Stage-specific genes identified in the early berry development of seedless grapevine cv. Sultanina

RT-qPCR has been readily integrated to validate the results of many primary differential gene expression screening methods like cDNA arrays, DD-PCR (Polimerase chain reaction, digital-display), Serial Analysis of Gene Expression (SAGE), subtraction hybridization, RDA and cDNA-AFLP (Rajeevan et al. 2001; Polesani et al. 2008). Before assaying candidate genes, four genes previously assumed as constitutively expressed in grapevine (Reid et al. 2006) were assayed with samples from the five DS of Sultanina berries from the harvest season (2004/2005). In our experiments, while glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and a SAND-family member proved not to be constitutively expressed (data not shown), actin and α -tubulin (*VvACT* and *VvTUB*, respectively) exhibited the best results, as shown in Figure 4K. Their expressions showed the minimal variation in every DS tested when normalized to each other and, therefore, both were used as internal controls to normalize the amount of mRNA for all candidate genes present in each sample, according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen 2001).

Seven out of the nine candidate genes selected from the BRAT-derived EST collection proved to be in agreement with to their commitment in a specific DS, at least in what concerned steady-state mRNA levels.

Fruit-set (DS0) and two-weeks after DS0 (DS2) stage-specific genes

In stenospermaric grapevine cultivars like Sultanina, seed development is expected to cease three to six-weeks after anthesis (Pratt 1971). Therefore we expect to find crucial gene transcripts involved in seed abortion between DS0 and DS4. Amongst 86 TDFs specific to DS0 (Figure 3), we selected three candidates for further analysis by RT-qPCR. A putative gene coding for an oligouridylate binding protein (*VvUBPI*) was identified and confirmed to be mostly expressed in the initial DS0 and DS2 stages

(Figure 4A) of berry formation. UBP1 is a heterogeneous-nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) previously identified in plant nuclear extracts with a general role in pre-mRNA maturation. It is often associated to U-rich introns, suggesting that UBP1 is important to recruit the splicing machinery to pre-mRNAs. It was also proposed that these proteins function as a complex to stabilize mRNA by binding to U-rich sequences (Lambermon et al. 2000). Plant UBP1 was additionally described to be important for alternative splicing (Staiger et al. 2003) and for the formation of microRNAs (miRNAs) that may cause translational repression/mRNA cleavage (Arteaga-Vázquez et al. 2006). Based on these activities, we therefore must consider *VvUBP1* an interesting candidate to be further investigated regarding the seedlessness phenotype.

The second candidate gene selected from the DS0 collection of TDFs was named *VvFS41*. It codes for a putative S1-like ribosomal protein that, in conjunction with rRNA molecules, make up ribosomal subunits involved in the cellular process of translation. They are also described to be responsible for the stabilization of highly compact rRNA structures by filling the gaps between RNA domains (Gueydan et al. 2002). Although *VvFS41* codes for a ribosomal protein with apparently general and essential functions for all plant cells, and not exclusively to seed formation, our observations that it is mostly expressed during DS0 and DS2 (Figure 4B) is in accordance to the fact that it is exactly at these stages that most RNA and protein synthesis and processing occur, i.e., during cell division in berries (Figure 1A). Important to mention that our choice to select these candidates was based on the fact that they belonged to some of the most populated clusters of TDFs obtained after RDA subtraction.

A gene encoding a Heat shock protein 70 (Hsp70), putatively related to the plant Hypersensitive Response (HSR) and named *VvPHP1*, was the third candidate gene whose mRNA was amongst the richest ones during DS0 according to the BRAT analysis. RT-qPCR revealed however that *VvPHP1* mRNA accumulated mostly at DS6 and DS8 stages of grape fruit development (Figure 4C). Although we cannot explain such discrepancy, it is reasonable to believe that genes related to plant defense like Hsp70 would increase their expressions at the end of fruit and seed formation, after the burst of cell division and when summer temperatures tend to increase (Figure 1A). It is also at these stages that fruits and seeds start accumulating more nutritious products therefore starting to attract insects and other herbivores. Within the diverse Hsp gene family, Hsp70 is the most studied member. The encoded and highly conserved 70 kDa

protein-member plays a key role in the stress response in plants (Vierling 1991), as it does in mammals (Ohtsura and Hata 2000). It is reported that Hsp mRNA increases in the plant cytosol in response to different types of stresses, especially higher temperatures (Mishra et al. 2002; Cronjé et al. 2004). It is believed that Hsp proteins function as chaperones of denatured proteins as well as assisting in the translocation and/or degradation of damaged proteins (Bukau and Horwich 1998).

Four-weeks after DS0 (DS4) stage-specific genes

The RDA subtraction according to our BRAT strategy allowed us to rescue 75 classes of TDFs specific to DS4 (Figure 3). RT-qPCR analysis proved that all four candidate genes elected from this group confirmed their higher steady-state mRNA levels around the middle stage of berry formation (Figure 1A), especially at DS4 (Figure 4D-G). The first candidate, named *VvRIP1*, is an ASR-like (Abscisic acid Stress Ripening) gene putatively encoding a ripening-induced protein. ASR-like genes were reported to be involved in water stress transcriptional response and their expressions were also detected during fruit ripening in several plant species (Maskin et al. 2001). The *Arabidopsis thaliana* genome lacks ASR-like genes and only one copy has been detected in grapes using Southern blot hybridization (Cakir et al. 2003). Interestingly in tomato, the ASR1 protein was localized in the nucleus and shown to bind a specific DNA sequence (Kalifa et al. 2004). Moreover, ASR proteins from other species, including grapevine, were also localized in the nucleus where they were proposed to regulate specific promoters (Cakir et al. 2003; Wang et al. 2005; Yang et al. 2005). These findings suggested that ASR proteins are transcription factors whose likely targets are hexose transporters and abscisic acid (ABA) responsive genes. Since many ASR genes are themselves induced by ABA and regulate genes involved in sugar transport and ABA response, a cross-talk between plant hormones and sugars responding to water stress can be speculated. In fact, ABA and sugars act in a concerted fashion during developmental processes in plants (Filkelstein and Gibson 2002). Being highly expressed during DS4, we propose that *VvRIP1* is not involved in the start of hexose synthesis since only during DS8 such compounds start accumulating in grape berries (Figure 1A). Due to the strong effect of ABA on seed formation (Frey et al. 2004), *VvRIP1* could be one of the factors involved in seed malformation in Sultanina seedless grape as an ABA-responsive gene. Such speculation is corroborated by the fact that endosperm degeneration in Sultanina seedless grapes occurs between the 3rd and

6th week after anthesis (Stout 1936), exactly the period of the highest expression of *VvRIP1*.

A cytochrome P450 (CYP450) putatively encoded by one of the most populated TDF clusters was also one of the selected candidate genes at DS4. CYP450 is known to belong to a very large and diverse superfamily of hemoproteins that use a plethora of both exogenous and endogenous compounds as substrates in enzymatic reactions. They are usually part of multicomponent electron transfer chains, called P450-containing systems that are known to lead to the synthesis of various fatty acid conjugates, plant hormones, defensive compounds, or medically important drugs, for instance. Terpenoids, which represent the largest class of characterized natural plant compounds, are often substrates for plant CYP450 (Tanabe et al. 2005; Ehlting et al. 2008). In *Arabidopsis*, Ito and Meyerowitz (2000) described a mutant named 28-5 ap2-1 in which the overexpression of the CYP450-like enzyme CYP78A9 induced large and seedless fruits. Although the function of the proteins encoded by the CYP78A subfamily is still unknown, members of this family have been isolated as coding for floral- or meristematic-specific transcripts (Nadeau et al. 1996; Zondlo and Irish 1999; Ito and Meyerowitz 2000). It has been speculated that one of the functions of the CYP78A subfamily members may be the production of signals that activates or enhances fruit development due to its wide involvement in synthesis or degradation of plant secondary products (Ito and Meyerowitz 2000). The strong effects of the CYP78A9 overexpression in *Arabidopsis* can be intuitively compared to the data observed for the *VvP450* expression profile in the seedless cv. Sultanina. RT-qPCR analysis proved that *VvP450* shows its higher steady-state mRNA level around the middle stage of berry formation (Figure 4E), especially at DS4. Given the fact that endosperm degeneration in Sultanina seedless grapes occurs between the 3rd and 6th week after anthesis (Stout 1936), exactly the period of the highest expression of *VvP450*, it is tempting to speculate that *VvP450* may exert a specific influence either on seed formation or on seed abortion.

A cDNA putatively encoding a transcription factor homologous to the *Arabidopsis* DOF zinc-finger protein family was also identified at DS4. DOF proteins share a DNA-binding domain of 52 amino acid residues that is structured as a Cys₂/Cys₂ Zn²⁺ finger (Umemura et al. 2004) that recognizes *cis*-regulatory elements in the promoters of their target genes containing the common core 5'-AAAG-3' (Yanagisawa and Schmidt 1999). According to the RT-qPCR analysis, *VvDOF1* steady-state mRNA

level was increased at DS2, keeping such high levels until DS6. Like *VvP450*, its highest expression was coincident with the period of embryo death in Sultanina grapes (Bouquet and Danglot 1996). Therefore it is again tempting to speculate that *VvDOF1* is also a key candidate gene to be investigated during grape fruit and seed development. Supporting that, DOF-domain proteins were described to be involved in seed germination (Papi et al. 2000; Gualberti et al. 2002), although many other physiological roles were proposed for these proteins to date. The roles include stress-responses (Zhang et al. 1995; Chen et al. 1996; Kang et al. 2003), light-responses (Yanagisawa and Sheen 1998; Yanagisawa 2000; Papi et al. 2002), phytochrome signaling (Park et al. 2003), responses to plant hormones including auxin (De Paolis et al. 1996; Kisu et al. 1998) and gibberellin (Washio 2001; Mena et al. 2002), and tissue specific expression in endosperms (Vicente-Carbajosa et al. 1997; Mena et al. 1998), leaves (Yanagisawa and Sheen 1998) or guard cells (Plesh et al. 2001).

The last candidate gene selected among the most expressed ones at DS4 by BRAT was *VvERF1*, named after *V. vinifera* Ethylene-responsive transcription factor (ERF) TINY-like. RT-qPCR analysis however showed that *VvERF1* was actually more highly expressed at DS2. Like in the case of *VvUBP1* it is important take into account that the DS4 “tester” cDNA population was subtracted with an equivalent mixture of FS DS0 and DS8 cDNAs as “driver”, thus the relative amount of the transcripts in the final pool is an average of the original samples. Therefore the higher expression of *VvERF1* in DS2 and DS4 is in agreement with the BRAT strategy. The ERF is a large family of transcription factors that belongs to the AP2/ERF superfamily which also contains the AP2 and RAV families (Riechmann et al. 2000). It has been demonstrated that AP2/ERF proteins have important functions in the transcriptional regulation of a variety of biological processes related to growth and development, as well as various responses to environmental stimuli. While genes of the AP2 family have been shown to participate in the regulation of processes like flower development (Elliot et al. 1996), spikelet meristem determinacy (Chuck et al. 1998), leaf epidermal cell identity (Moose and Sisco 1996) and embryo development (Boutilier et al. 2002), the involvement of RAV family members was shown to be more related to ethylene (Alonso et al. 2003) and brassinosteroid (Hu et al. 2004) responses. Likewise, after finding the first ERFs in tobacco, many proteins in the ERF family were identified and implicated in many cellular processes such as hormonal signal transduction (Ohme-Takagi et al. 1995), response to biotic (Yamamoto et al. 1999; Gu et al. 2000) and abiotic stresses (Liu et al.

1998; Dubouzet et al. 2003), regulation of metabolism (Broun et al. 2004; Zhang et al. 2005), and in developmental processes (Banno et al. 2001; Chuck et al. 2002) in various plant species. It is therefore important to consider *VvERF1* a good candidate related to seed degeneration in Sultanina grapevine due to the time of its expression and its potential roles in seed development.

Eight-weeks after DS0 (DS8) stage-specific genes

The highest numbers of stage-specific gene singletons (218) and clusters (14) resulting from our BRAT subtraction were found at DS8 (Figure 3).

A probable gibberellin receptor similar to *Arabidopsis* *GID1L1* was present amongst the most abundant transcript clusters at DS8. RT-qPCR analysis showed that this class of transcripts was also equally abundant at DS2 (Figure 4H). As observed for *VvUBP1* and *VvDOF1*, DS8 “tester” cDNA population was subtracted with an equivalent mixture of DS0 and DS4 cDNAs. Therefore the higher expression of *VvGID1L1* at DS2 as well as at DS8 is in agreement with the BRAT strategy employed. Biologically active concentrations of gibberellins in grapevines were described to be high in flowers and in fruits just after anthesis, but then usually drop to lower levels over the course of berry development (Symons et al. 2006). Nevertheless, according to Perez et al. (2000), there is a second peak of active gibberellins at the start of the lag phase which coincides exactly with the beginning of DS8 (Figure 1A), and it is 77 times higher in the seed when compared to the berry mesocarp. Additionally, gibberellins are known to promote seedlessness in seeded grapes and to help suppressing vestigial seed development in seedless grapes (Ben-Tal 1990; Agüero et al. 2000; Fanizza et al. 2005). Hence the presence of *VvGID1L1* at DS8 (and DS2) in Sultanina berries corroborate these observations and reinforces our speculation that it may be implicated in the initial steps of seed abortion. Hypothetically, higher concentrations of a gibberellin receptor like *GID1L1* would be typical in stenospermocarpic grapes, making them more sensitive to very low concentrations of the hormone and therefore determining, at least in part, the seedlessness phenotype.

Very little is known about the role of gibberellin in grape berry development (seeded cultivar) except a possible role in cell enlargement. The transcript abundance of two putative GA receptors, *GIDL1* and *GIDL2* increased during berry development. Interestingly, the transcript abundance of the GA signaling pathway repressor, *GAI1*

declines transiently at *véraison*. The transcript abundance of a putative GA β -hydroxylase declines over the course of berry development more or less coincident with the known accumulation pattern of GA1 in developing berries (Deluc et al. 2007).

Another candidate gene, named *VvCLP1*, was also found amongst the most populated clusters at DS8 according to our BRAT methodology. Nevertheless, differently from *VvGID1L1*, it did not confirmed higher transcript abundance at this stage by RT-qPCR. On the contrary and most surprisingly, it exhibited the lowest level of steady state mRNA exactly at DS8 (Figure 4I). Thus, it's no possible to validate the results obtained by the BRAT method.

VvCLP1 putatively encodes a CONSTANS-Like (COL) Protein 2. The COL genes encode members of a family of plant zinc finger proteins arranged into three subgroups on the basis of variations within the B-box region. *VvCLP1* would belong to the first subgroup whose members detain two B-boxes (Robson et al. 2001). Numerous COL genes have been correlated to different aspects of plant flowering, especially in what concerns photoperiod and the circadian clock (Wenkel et al. 2006; Kim et al. 2007). At the best of our knowledge, COL genes were never associated with seed formation. Such assumption will therefore need a deeper characterization of the *VvCLP1* candidate gene.

Hanania et al. (2007) has recently suggested that a key protein determining seedlessness in grapes is the chloroplast chaperonin 21 (ch-Cpn21), identified after suppression subtractive hybridization analysis between seeded and seedless grapevine lines of cv. Sultanina. These authors showed that ch-Cpn21 silencing in tobacco and tomato plants using VIGS resulted in growth reduction, chlorosis and seed abortion, reinforcing the idea of a key role for ch-Cpn21 in seed formation. From the data presented by Hanania et al. (2007) it seems clear that down-regulation of ch-Cpn21 is correlated with the seedless phenotype, indicating that the absence and/or lower levels of ch-Cpn 21 may lead to seed abortion. In our study, the lower levels of *VvCPN21* were shown exactly at the time course of the early berry development, when degeneration of the endosperm takes place. Interestingly, the expression of the putative ch-Cpn21 gene (*VvCPN21*) was highest only at DS6 (Figure 4J), when seeds would be already fully developed in normal grapes.

Our main objective with the present work was to establish a first profile of gene expression during key stages of grape fruit development in a seedless cultivar model like Sultanina. In doing so, and with a subtractive approach like BRAT, it is very

tempting to speculate on the commitment of the above mentioned candidate genes as related, at least in part, with the seedless phenotype in grapevine. Recent works like Pilati et al. (2007) and Deluc et al. (2007) focused of gene expression during fruit development in seeded grapevine cultivars. The recent work of Grimplet et al. (2007), provided a long description of the functional classes and the results obtained revealed new knowledge in standard tissue-specific expression of a long repertoire of genes expressed in tissues of the fruit. These authors were able to characterize critical genes whose expressions may program the cellular metabolism mostly through hormonal signaling and transcriptional regulation. Nevertheless, these authors have not established a link between seeded and seedless grapes. It is therefore our next effort to assess the gene expression of the candidate genes described in the present work and elsewhere, including ch-Cpn21, exactly between seeded and seedless grape cultivars and considering the critical developmental stages here tested.

Final considerations

We have performed a strategy with the aim to identify genes differentially expressed during the early berry development of the seedless grape cv. Sultanina. The procedure was based on the traditional RDA originally developed by Hubank and Schatz (1994) combined with a subtraction step in which the driver is composed of an equivalent mixture of cDNA samples (BRAT). Using this strategy we were able to generate three stage specific libraries during the early berry development corresponding to DS0, DS4 and DS8. Considering candidate genes selected among differentially expressed ones isolated by BRAT we believe that genes encoding (i) an oligouridylate-binding protein, (ii) a ripening-induced protein, (iii) a cytochrome P450, (iv) a DOF-like protein; (v) an ethylene-responsive transcription factor TINY-like, and (vi) a gibberellin GID1L1-like receptor are the most promising ones when considering seedless grape fruits of cv. Sultanina and will be used in further analysis to demonstrate their participation in the development of the seedless phenotype. Our research focused on the study of fruit development in a variety of seedless grape, searching to know the genes involved in the initial process of developing this type of fruit. For further analysis, we intend to make a comparison by RT-qPCR between the expression profiles in seeded and seedless grapes and characterize functionally these candidate genes.

Acknowledgments This research was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Proc. 475440/2004-8) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul Proc. 04/1184.6). We are grateful to Philippe B. Irala and Fernanda Sbeghen for their assistance in collecting the samples in the experimental fields and Vanessa Buffon for the technical assistance. We thank Georgios Pappas Jr., Roberto Togawa and Marcos Mota Costa (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF - Brazil) for their assistance with the bioinformatic analysis.

References

Adam-Blondon, AF, Lahogue-Esnaulf F, Bouquet A, Boursiquot JM, This P (2001) Usefulness of two SCAR markers for marked-assisted selection of seedless grapevine cultivars. *Vitis* 40:147-155

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

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen HM, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653-657

Arteaga-Vázquez M, Caballero-Pérez J, Vielle-Calzada JP (2006) A family of MicroRNAs present in plants and animals. *Plant Cell* 18:3355-3369

Banno H, Ikeda Y, Niu QW, Chua NH (2001) Overexpression of *Arabidopsis* ESR1 induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell* 13:2609-2618

Ben-Tal Y (1990) Effects of gibberellin treatments on ripening and berry drop from Thompson Seedless grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:142-146

Boss PK, Sensi E, Hua C, Davies C, Thomas MR (2002) Cloning and characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Sci.* 162:887-895

Boss PK, Thomas MR (2002) Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* 46:847-850

- Bouquet A, Danglot Y (1996) Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* 35:35-42
- Boutillier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang LM, Hattori J, Liu CM, van Lammeren AAM, Miki BLA, Custers JBM, van Lookeren Campagne MM (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14:1737-1749
- Broun P, Poindexter P, Osborne E, Jiang CZ, Riechmann JL (2004) WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:4706-4711
- Bukau B, Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351-366
- Cabezas JA, Cervera MT, Ruiz-Garcia L, Carreño J, Martínez-Zapater JM (2006) A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome* 49:1572-1585
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15:2165-2180
- Carmona MJ, Chaïb J, Martínez-Zapater JM, Thomas MR (2008) A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *J. Exp. Bot.* 59(10):2579-2596
- Chuck G, Meeley RB, Hake S (1998) The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2-like gene indeterminate spikelet. *Genes Dev.* 12:1145-1154
- Chuck G, Muszynski M, Kellogg E, Hake S, Schmidt RJ (2002) The control of spikelet meristem identity by the branched silkless1 gene in maize. *Science* 298:1238-1241
- Costantini L, Battilana J, Lamaj F, Fanizza G, Grando MS (2008) Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): from quantitative trait loci to underlying genes. *BMC Plant Biol.* 8:38
- Cronjé MJ, Weir IE, Bornman L (2004) Salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 induction correlates with reduced apoptosis in tobacco protoplasts. *Cytometry* 61A:76-87
- Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, Tillet RL, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC, Cramer GR (2007) Transcriptomic and metabolite analysis of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* 8:429
- De Paolis A, Sabatini S, De Pascalis L, Costantino P, Capone I (1996) A rolB regulatory factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins. *Plant J.* 10:215-223
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L, encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J.* 33:751-763

- Ehltig J, Sauveplane V, Olry A, Ginglinger J-F, Provart NJ, Werck-Reichhart D (2008) An extensive (co) expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 8: 47
- Elliott, RC, Betzner, AS, Huttner, E, Oakes, MP, Tucker, WQJ, Gerentes, D, Perez, P, and Smyth, DR (1996) A *INTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* 8:155-168
- Fanizza G, Lamaj F, Costantini L, Chaabane R, Grando MS (2005) QTL analysis for fruit yield components in table grapes (*Vitis vinifera*). *Theor. Appl. Genet.* 111:658-664
- Fernandez L, Romieu C, Moing A, Bouquet A, Maucourt M, Thomas MR, Torregrosa L (2006) The grapevine fleshless berry mutation. A unique genotype to investigate differences between fleshy and non fleshy fruit. *Plant Physiol.* 140:537-547
- Filkelstein R, Gibson SI (2002) ABA and sugar interactions regulating development: “cross-talk” or “voices in a crowd”? *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:26-32
- Frey A, Godin B, Bonnet M, Sotta B, Marion-Poll A (2004) Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana glauca*. *Planta* 218:958-964
- Grimplet J, Deluc LG, Tillett RL, Wheatley MD, Schlauch KA, Cramer GR, Cushman JC (2007) Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics* 8:187
- Gu YQ, Yang C, Thara VK, Zhou J, Martin GB (2000) *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the *Pto* kinase. *Plant Cell* 12:771-786
- Gualberti G, Papi M, Bellucci L, Ricci I, Bouchez D, Camilleri C, Costantino P, Vittorioso P (2002) Mutations in the Dof zinc finger genes *DAG2* and *DAG1* influence with opposite effects the germination of *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 14:1-11
- Gueydan C, Wauquier C, De Mees C, Huez G, Krays V (2002) Identification of Ribosomal Proteins Specific to Higher Eukaryotic Organisms. *J. Biol. Chem.* 277:45034-45040
- Hanania U, Velcheva M, Or E, Flaishman M, Sahar N, Perl A (2007) Silencing of chaperonin 21, that was differentially expressed in inflorescence of seedless and seeded grapes, promoted seed abortion in tobacco and tomato fruits. *Transgenic Res.* 16:515-525
- Hu YX, Wang YX, Liu XF, Li JY (2004) *Arabidopsis* *RAVI* is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Res.* 14:8-15
- Hubank M, Schatz DG (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res.* 22:5640-5648

- Ito T, Meyerowitz EM (2000) Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, CYP78A9, induces large and seedless fruit in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:1541-1550
- Kalifa Y, Perlson E, Gilad A, Konrad Z, Scolnik PA, Bar-Zvi D (2004) Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant Cell Environ.* 27:1459-1468
- Kang H-G, Foley RC, Oñate-Sánchez L, Lin C, Singh KB (2003) Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix–loop–helix domain proteins inducible by salicylic acid. *Plant J.* 35:362-372
- Kim SL, Lee S, Kim HJ, Nam HG, An G (2007) *OsMADS51* is a shortday flowering promoter that functions upstream of *Ehd1*, *Os-MADS14*, and *Hd3a*. *Plant Physiol.* 145:1484-1494
- Kimura PH, Okamoto G, Hirano K (1996) Effects of gibberellic acid and streptomycin on pollen germination and ovule and seed development in Muscat Bailey. *Am. J. Enol. Vitic.* 47:152-156
- Kisu Y, Ono T, Shimofurutani N, Suzuki M, Esaka M (1998) Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. *Plant Cell Physiol.* 39:1054-1064
- Lahogue F, This P, Bouquet A (1998) Identification of a codominant marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 97:950-959
- Lambermon MHL, Simpson GG, Wiczyrek Kirk DA, Hemmings-Mieszczak M, Klahre U, Filipowicz W (2000) *UBP1*, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps of higher plant nuclear pre-mRNA maturation. *EMBO J.* 19:1638-1649
- Ledbetter CA, Ramning DW (1989) Seedlessness in grapes. *Hort. Rev.* 11:159-184
- Ledbetter CA, Shonnard CB (1990) Improved seed development and germination of stenospermocarpic grapes by plant growth regulators. *J. Hort. Sci.* 65:269-274
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1391-1406
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCT Method. *Methods* 25:402-408
- Loomis NH, Weinberger JH (1979) Inheritance studies of seedlessness in grape. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104:181-184
- Lorenz DH, Eichhorn KW, Bleiholder H, Klose R, Meier U, Weber E. (1995) Phenological growth stages of the grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*) – Codes and descriptions according to the extended BBCH scale. *Aust. J. Grape Wine Res.* 1:100-110

- Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER (2001) Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J. Mol. Diagn.* 3:26-31
- Maskin L, Gudesblat GE, Moreno JE, Carrari FO, Frankel N, Sambade A, Rossi M, Iusem, ND (2001) Differential expression of the members of the *Asr* gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Sci.* 161:739-746
- Mejía N, Gebauer M, Muñoz L, Hewstone N, Muñoz C, Hinrichsen P (2007) Identification of QTLs for Seedlessness, Berry Size and Ripening Date in a Seedless x Seedless Table Grape Progeny. *Am. J. Enol. Vitic.* 58:499-507
- Mena M, Cejudo FJ, Isabel-Lamoneda I, Carbonero P (2002) A Role for the DOF Transcription Factor BPBF in the Regulation of Gibberellin-Responsive Genes in Barley Aleurone. *Plant Physiol.* 130:111-119
- Mena M, Vicente-Carbajosa J, Schmidt RJ, Carbonero P (1998) An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm. *Plant J.* 16:53-62
- Mishra SK, Tripp J, Winkelhaus S, Tschiersch B, Theres K, Nover L, Scharf K-D (2002) In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev.* 16:1555-1567
- Moose SP, Sisco PH (1996) Glossy15, an *Apetala2*-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes Dev.* 10, 3018-3027
- Murray D, Doran P, Padraic M, Moss AC (2007) In silico gene expression analysis – an overview. *Mol. Cancer* 6:50
- Nadeau JA, Zhang XS, Li J, O'Neill SD (1996) Ovule development: Identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs. *Plant Cell* 8:213-239
- Nitsch JP, Pratt C, Nitsch C, Shaulis NJ (1960) Natural growth substances in Concord and Concord seedless in relation to berry development. *Am. J. Bot.* 47:566-576
- Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an Ethylene-Responsive Element. *Plant Cell* 7:173-182
- Ohtsuka K, Hata M (2000) Molecular chaperones function of mammalian Hsp70 and Hsp40 - a review. *Int. J. Hyperther.* 16:231-245
- Papi M, Sabatini S, Bouchez D, Camilleri C, Constantino P, Vittorioso P (2000) Identification and disruption of an *Arabidopsis* zinc finger gene controlling seed germination. *Genes Dev.* 14:28-33
- Papi M, Sabatini S, Altamura MM, Hennig L, Schäfer E, Costantino P, Vittorioso P (2002) Inactivation of the phloem-specific Dof zinc finger gene DAG1 affects response to light and integrity of the testa of *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol.* 128:411-417

- Park DH, Lim PO, Kim JS, Cho DS, Hong SH, Nam HG (2003) The *Arabidopsis* COG1 gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *Plant J.* 34:161-171
- Pastorian K, Hawell L III, Byus CV (2000) Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem.* 283:89-98
- Perez FJ, Viani C, Retamales J (2000) Bioactive gibberellins in seeded and seedless grapes: identification and changes in content during berry development. *Am. J. Enol. Vitic.* 51:315-318
- Pilati S, Perazzolli M, Malossini A, Cestaro A, Demattè L, Fontana P, Dal Rì A, Viola R, Velasco R, Moser C (2007) Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison. *BMC Genomics* 8:428
- Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B (2001) Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant J.* 28:455-464
- Polesani M, Desario F, Ferrarini A, Zamboni A, Pezzotti M, Kortekamp A, Polverari A (2008) cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 9:142
- Pratt C (1971) Reproductive anatomy in cultivated grapes: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 22:92-109
- Reid KE, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* 6:27
- Reynolds AG, Roller JN, Forgione A, De Savigny C (2006) Gibberellic acid and basal leaf removal: implications for fruit maturity, vestigial seed development, and sensory attributes of Sovereign Coronation table grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:41-53
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang CZ, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G-L (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290:2105-2110
- Robson F, Costa MM, Hepworth SR, Vizir I, Pineiro M, Reeves PH, Putterill J, Coupland G (2001) Functional importance of conserved domains in the Flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J.* 28:619-631
- Srinivasan C, Mullins MG (1978) Control of flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Physiol.* 61:127-130
- Staiger D, Zecca L, Wieczorek Kirk DA, Apel K, Eckstein L (2003) The circadian clock regulated RNA binding protein AtGRP7 auto regulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. *Plant J.* 33:361-371

- Stout AB (1936) Seedlessness in grapes. *Agr. Expt. Sta.* 238:1-68
- Symons GM, Davies C, Shavrukov Y, Dry IB, Reid JB, Thomas MR (2006) Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiol.* 140:150-158
- Tanabe S, Ashikari M, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Yano M, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Fujisawa Y, Kato H, Iwasaki Y (2005) A Novel Cytochrome P450 is implicated in Brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a Rice Dwarf Mutant, dwarf11, with reduced seed length. *Plant Cell* 17:776-790
- Umemura Y, Ishiduka T, Yamamoto R, Esaka M (2004) The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as a Cys2/Cys2 Zn finger domain. *Plant J.* 37(5):741-749
- Vicente-Carbajosa J, Moose SP, Parson RL, Schmidt RJ (1997) A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:7685-7690
- Vierling E (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42:579-620
- Washio K (2001) Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grains. *Biochim. Biophys. Acta* 1520:54-62
- Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierc J, Samach A, Coupland G (2006) CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate Flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:2971-2984
- Yamamoto S, Suzuki K, Shinshi H (1999) Elicitor-responsive, ethylene-independent activation of GCC box-mediated transcription that is regulated by both protein phosphorylation and dephosphorylation in cultured tobacco cells. *Plant J.* 20:571-579
- Yang C-Y, Chen Y-C Jauh GY, Wang C-S (2005) A Lily ASR Protein Involves Abscisic Acid Signaling and Confers Drought and Salt Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139:836-846
- Yanagisawa S (2000) Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J.* 21:281-288
- Yanagisawa S, Sheen J (1998) Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell* 10:75-89
- Yanagisawa S, Schmidt RJ (1999) Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J.* 17:209-214
- Zhang B, Chen W, Foley RC, Büttner M, Singh KB (1995) Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences. *Plant Cell* 7:2241-2252

Zhang JY, Broeckling CD, Blancaflor EB, Sledge MK, Sumner LW, Wang ZY (2005) Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J.* 42: 689-707

Zondlo SC, VF Irish (1999) CYP78A5 encodes a cytochrome P450 that marks the shoot apical meristem boundary in *Arabidopsis*. *Plant J.* 19:259-268

Figure Legends

Figure 1 (A) Representation of main grape fruit developmental stages from budburst until fruit harvesting (Figure modified by Carmona et al. (2008). Main fruit, cellular, biochemical and physiological aspects are indicated. (B) Sultanina grape seedless fruits at fruit set (DS0) and at developmental stages (DS) of 2, 4, 6 and 8 weeks after DS0. Pictures were taken by L.F. Revers at EMBRAPA Uva & Vinho in Bento Gonçalves, RS, Brazil, in January-February 2005. (C) The strategy of Bulk Representational Analysis of Transcripts (BRAT) employed to generate subtracted libraries from early developmental stages of Sultanina grape seedless berries.

Figure 2 Differential cDNA products obtained by BRAT. Lanes 1, 5 and 9 represent Tester cDNAs, 2, 6 and 10 represent Driver cDNAs, 3, 7 and 11 are the Differential Products after the first subtraction (DP1) and 4, 8 and 12 are the Differential Products after the second subtraction (DP2) representing libraries L1, L2 and L3 respectively. M indicates the 100 bp-DNA ladder (Invitrogen).

Figure 3 Differential Digital Display (DDD) analysis of transcripts from DS0, DS4 and DS8 stages of cv. Sultanina berries represented as a diagram of Venn. In the areas of intersection contains the number of common most populated clusters in two or more libraries. Underlined numbers refer to transcript singletons and unmarked numbers refer to transcript clusters.

Figure 4 Relative gene expression of *VvUBP1*, *VvFS41*, *VvPHP1*, *VvRIP1*, *VvP450*, *VvDof1*, *VvERF1*, *VvGID1L1*, *VvCLP1*, *VvCPN21* and reference genes *VvACT* and *VvTUB* measured by RT-qPCR at different fruit developmental stages during harvest 2004/2005. Developmental stages (DS0 to DS8) are represented at the X-axis and relative expressions to DS0 stage at the Y-axis. Expressions of the reference genes *VvACT* and *VvTUB* (K) were used to normalize the expression values of all candidate genes. Bars marked by rectangles represent the developmental stage from which every candidate gene was originally isolated by BRAT (A to I). All data are presented as mean of four technical replicates.

Tables

Table 1 Gene-specific PCR primers used for RT-qPCR.

Gene name		Sequence of Forward (F) and Reverse (R) primers
1	VvUBP1	F 5'GGGGTTTTGGGTTTGTTC R 5'GGCATCTGAATTTGGCTTGT
2	VvFS41	F 5'GAGACATCCTCACCTGCTC R 5'GACTATGACTGTTTTATCCTGA
3	VvPHP1	F 5'CATCCATCACCAACCCATT R 5'CCAACATGCAGTTCACCATC
4	VvRIP1	F 5'GGATCCTCGTTAAGGGATTTAGA R 5'CGCAAATTACCCAATCCTGA
5	VvP450	F 5'GCTCAACAGGGTCTTCTTTCC R 5'AACGGCGGGAGTAACTATGA
6	VvDof1	F 5'GAGAGTTCGATTTCCGCTCA R 5'GAACCAGGCCTTGAAGTGTC
7	VvERF1	F 5'TTCATCGTCTCCGTCCTCTC R 5'TGGGTGTCTGAAATTCGGGA
8	VvCLP1	F 5'TCGATATCGGAGAAGAACACC R 5'CCGGGGATGAGGAGGACT
9	VvGID1L1	F 5'CCCACCGTGGAAGAAAAGTA R 5'TGAGGGGGTGTCTCTTTTG
10	VvCPN21	F 5'GGGACAGAGGTGGAGTTCAA R 5'TTTCCTTGCTTGCCTCTGTT
11	VvACT	F 5'CTTGCATCCCTCAGCACCTT R 5'TCCTGTGGACAATGGATGGA
12	VvTUB	F 5'CAGCCAGATCTTCACGAGCTT R 5'GTTCTCGCGATTGACCATA

Table 2 Distribution of ESTs derived from BRAT analysis of Sultanina grape seedless berries.

Sultanina library	RDA-BRAT			Total
	DS0	DS4	DS8	
Sequenced clones	768	984	748	2,500
ESTs > 100 bp	538	457	559	1,554
Unigene set	175	169	441	785
Singletons	158	132	426	726
Clusters	17	37	15	69
Redundancy (%)	81.9	78.0	67.3	75.7
Novelty (%)	46.3	60.1	48.6	51.6

Only ESTs longer than 100 bp and with a Phred \geq 20 were included.

Table 3 Selected genes putatively involved in the regulation of early berry development of grape cv. Sultanina identified by BRAT analysis.

Clone name	Functional Categories	Genoscope Annotation	Best match in Databases/species	Putative functional identification	Library	Chromosome location
VvUBP1	Nucleotide binding	GSVIVT00016402001	gi 52126053 gb CV197216.1 (<i>Juglans regia</i>)	Oligouridylate binding protein-like	DS0	Chr_11
VvFS41	Protein biosynthesis	GSVIVT00025456001	gi 110705930 gb EE083344.1 (<i>Vitis vinifera</i>)	DNA binding protein	DS0	Chr_8
VvPHP1	No ontology found	No matches found	lcl TC62058 (<i>Mus musculus</i>)	Heat shock protein 70	DS0	Chr_11
VvRIP1	No ontology found	Scaffold_2539	lcl TC65996 (<i>Vitis vinifera</i>)	Ripening induced protein	DS4	Chr_6
VvP450	ATP-dependent peptidase activity	GSVIVT00001811001	lcl TC68767 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Cytochrome p450 like	DS4	Chr_18
VvDof1	Regulation of transcription	GSVIVT00017546001	gnl BL_ORD_1D 24989 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Dof zinc finger protein-like	DS4	Chr_17
VvERF1	Transcription factor activity	GSVIVT00032424001	gi 48428609 sp Q39127 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Ethylene-responsive transcription factor TINY	DS4	Chr_4
VvCLP1	DNA binding and zinc ion binding	GSVIVT00031464001	lcl TC56447 (<i>Mus musculus</i>)	CONSTANS-like protein 2	DS8	Chr_11
VvGID1L1	No onthology found	GSVIVT00006107001	lcl TC67464 (<i>Mus musculus</i>)	Probable gibberellin receptor	DS8	Chr_14
VvCPN21	Protein folding	GSVIVT00016397001	gi 50660326 gb AY680699.1 (<i>Vitis vinifera</i>)	<i>Vitis vinifera</i> chloroplast chaperonin 21 gene	Hanania et al., 2007	Chr_11

Figure 1

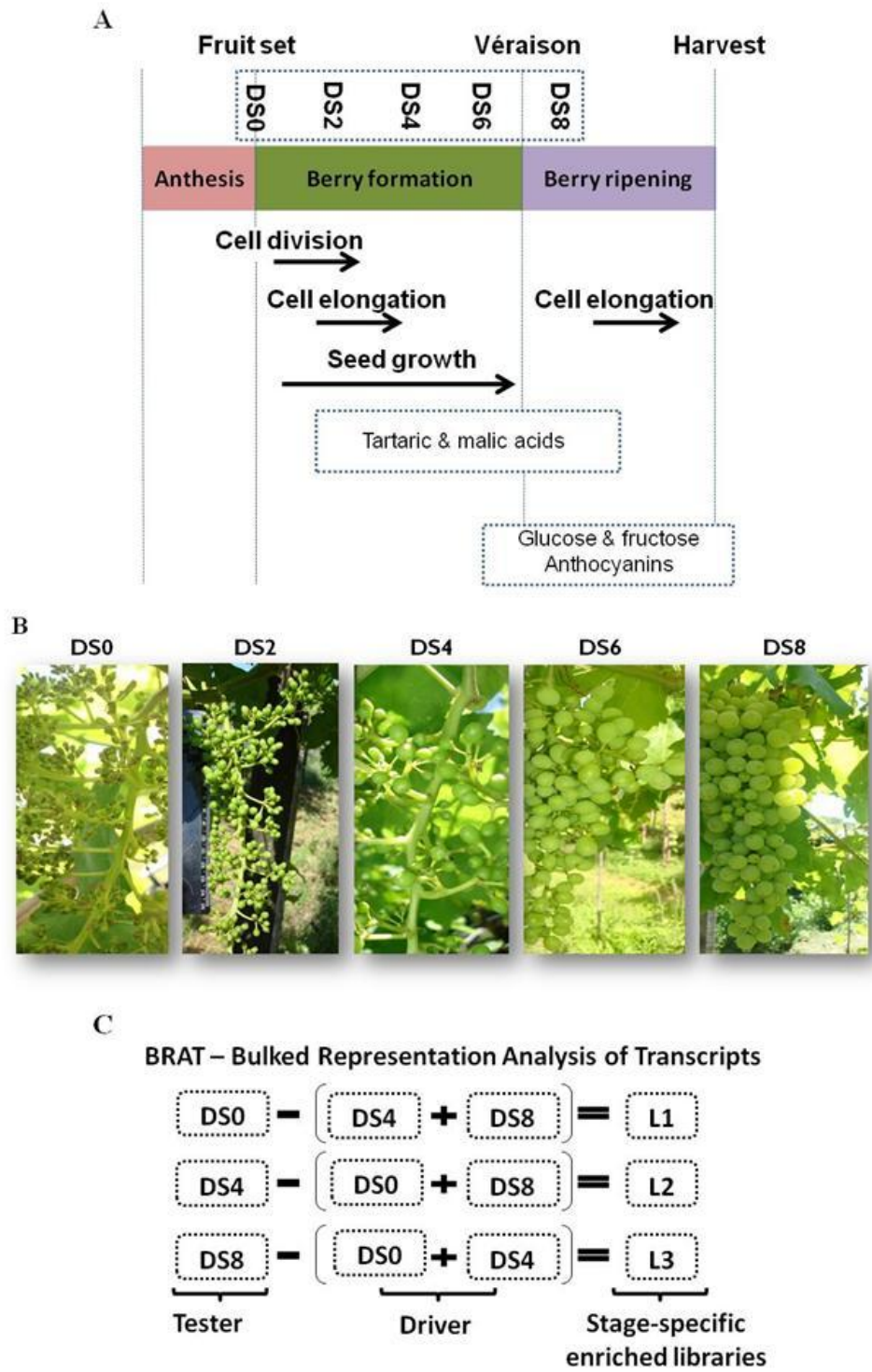


Figure 2

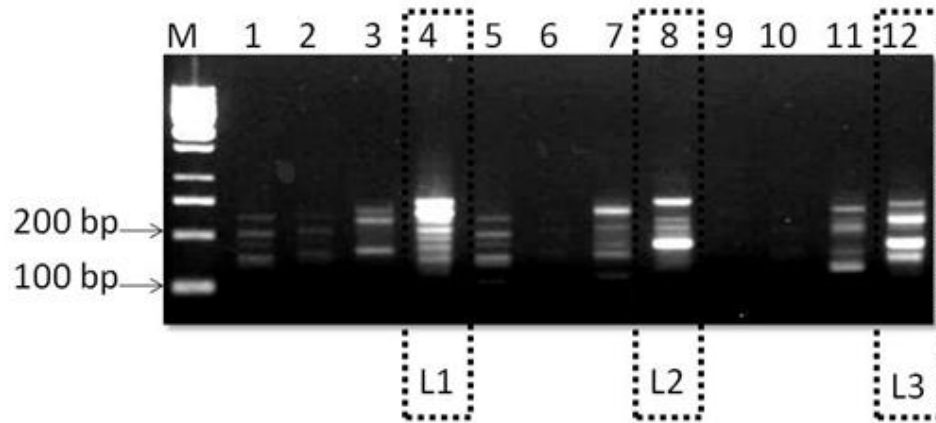


Figure 3

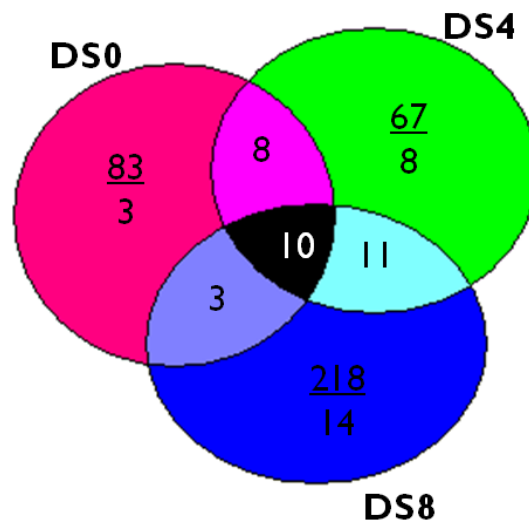
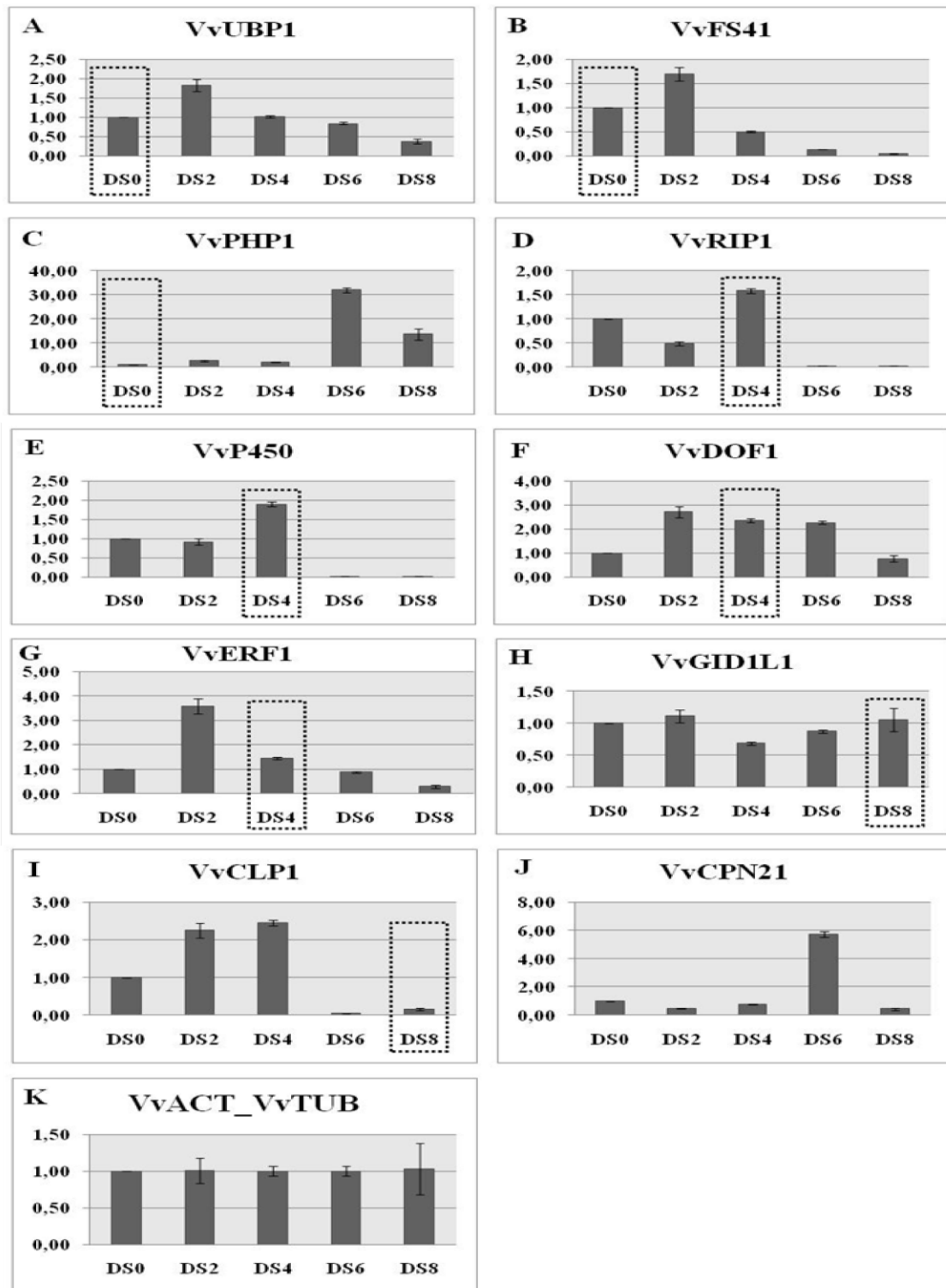


Figure 4



CAPÍTULO III

**Capítulo III. GENOME-WIDE COMPARATIVE ANALYSIS OF THE
DOF-TYPE GENE FAMILY IN GRAPEVINE**

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Plant Physiology*

GENOME-WIDE COMPARATIVE ANALYSIS OF THE DOF-TYPE GENE FAMILY IN GRAPEVINE¹

Danielle Costenaro da Silva^{2,3}, Georgios Joannis Pappas Jr.⁴, Vanessa Buffon⁵, João Antonio Pêgas Henriques², Giancarlo Pasquali², Luís Fernando Revers^{2,5*}

²Graduate Program in Cell and Molecular Biology, Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

³National Agricultural Laboratory, LANAGRO, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Laboratory of Bioinformatics, Brasília, DF, Brazil

⁵Laboratory of Plant Molecular Biology, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, Brazil

Financial support:

¹This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Ministry of Education), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Proc. 475440/2004-8, Ministry of Science and Technology) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - Proc. 04/1184.6).

*Corresponding Author

Dr. Luís Fernando Revers

Researcher – Plant Molecular Biology

Embrapa Uva e Vinho

515 Rua Livramento, Mail Box 130

CEP 95700-000

Phone: +55 54 3455-8039

Fax: +55 54 3451-2792

E-mail: luis@cnpuv.embrapa.br

ABSTRACT

The Dof protein family comprehends a group of plant-specific transcription factors involved in the regulation of different functions like plant responses to stress, hormones and light, phytochrome signaling, seed germination and spatial-specific gene expression. Here we describe the *Dof* gene family of grapevine (*Vitis vinifera* L.), which is composed by 26 *Dof*-encoding genes. The amino acid sequences deduced from all 26 grapevine *Dof* domains matched perfectly including cysteine residues critical for zinc binding and other residues known to be conserved in *Dof* transcription factors from *A. thaliana*, *O. sativa* and other plants. Based on the analysis of *Dof* domains, it is suggested that all grapevine *Dof* domains are possibly functional. The predicted physical localization of *Dof* genes in grapevine chromosomes is here presented. A phylogenetic study comparing grapevine *Dof* genes with their counterparts in the two other eudicots completely sequenced, *A. thaliana* and *Populus*, allowed to identify clear clusters of paralogous and orthologous genes. Finally, the expression profiles of all 26 *Dof* genes were studied by RT-qPCR in nine vegetative and reproductive grapevine organs.

INTRODUCTION

The Dof protein family is a recently discovered group of plant transcription factors ubiquitously present in the plant kingdom but absent in yeasts and animals (Yanagisawa, 1995). These proteins are characterized by a strikingly conserved amino acid segment of 52 amino acids, the Dof domain, encompassing a single CX₂CX₂₁CX₂C zinc finger, a C₂C₂-type zinc finger (Yanagisawa, 1995; Zhang et al., 1995; De Paolis et al., 1996; Vicente-Carbajosa et al., 1997; Mena et al., 1998). Throughout the Dof domain that is usually N-terminal, Dof transcription factors specifically bind AAAG sequences in plant gene promoters and exert their transcriptional regulation by their C-terminal domain (reviewed in Yanagisawa, 2004).

In contrast to the highly conserved DNA-binding domain, sequences outside the Dof domain diverge widely among Dof proteins. Such feature suggests that Dof proteins are involved in the regulation of different functions typical and of general relevance for plants. The few Dof proteins studied so far are involved in stress-response (Zhang et al., 1995; Chen et al., 1996; Kang and Singh, 2000; Kang et al., 2003), light-response (Yanagisawa and Sheen, 1998; Yanagisawa, 2000; Papi et al., 2002), phytochrome signaling (Park et al., 2003), response to plant hormones including auxins (De Paolis et al., 1996; Kisu et al., 1998) and gibberellins (Washio, 2001; Mena et al., 2002), seed germination (Papi et al., 2000; Gualberti et al., 2002; Papi et al., 2002), endosperm-specific expression (Vicente-Carbajosa et al., 1997; Mena et al., 1998), leaf-specific expression (Yanagisawa and Sheen, 1998) or guard cell-specific expression (Plesch et al., 2001). More recently, Imaizumi et al., (2005) and Skirycz et al., (2006) reported the involvement of Dof transcription factors in photoperiodic flowering and biosynthesis of the secondary metabolites glucosinolates, respectively.

After the first isolation of a cDNA from maize encoding a Dof domain protein (Yanagisawa and Izui, 1993), Dof transcription factors have been identified in a variety of angiosperms including *A. thaliana*, tobacco, potato, pumpkin, rice, wheat, sorghum and barley (reviewed in Yanagisawa, 2004). Reflecting several characteristics of Dof domain proteins, cDNAs were isolated by different strategies including sequence homology (Yanagisawa, 1995; Vicente-Carbajosa et al., 1997; Plesch et al., 2001), interaction with other proteins (Zhang et al., 1995), specific binding to DNA elements (De Paolis et al., 1996; Kisu et al., 1998; Washio, 2001) and abnormal phenotype (Park et al., 2003).

In terms of family composition, it has been reported 36 *Dof*-encoding genes and one pseudogene in *A. thaliana* (Yanagisawa, 2002). Thirty *Dof* genes were described in rice (Lijavetzky et al., 2003) and, in barley, 24 *Dof* genes were characterized from genomic, BAC and cDNA libraries (Mena et al., 1998; Isabel-LaMoneda et al., 2003). The work developed by Lijavetzky et al. (2003) with rice *Dof* genes allowed them to elaborate phylogenetic relationships with the *A. thaliana* counterparts and to suggest a classification of Dof proteins into four major clusters. Yang et al. (2006) developed a similar work, constructing a phylogenetic tree using Dof protein sequences from *P. trichocarpa* (*Populus* or poplar), *A. thaliana* and rice and pointing out 27 pairs of paralogous *Dof* genes among the three species. Aside from angiosperms, a single Dof-encoding gene in the green unicellular algae *Chlamidomonas reinhardtii* was described, nine *Dof* genes in the genome of the moss *Physcomitrella patens*, eight in the fern *Selaginella moellendor* and eight in the gymnosperm *Pinus taeda* (Moreno-Risueno et al., 2007).

Albeit the large number of references suggesting the Dof-mediated regulation of a wide range of plant physiological processes, few Dof proteins have in fact been proved to possess transcriptional regulatory effects. The maize protein PBF binds to zein gene promoters and interacts with the basic domain/leucine zipper protein Opaque2 (Vicente-Carbajosa et al., 1997). Its barley counterpart, BPBF, activates the β -hordein promoter with a similar mechanism that involves the interaction of the Dof transcription factor with another protein (Mena et al., 1998). In *A. thaliana*, three Dof proteins, OBP1 (Zhang et al., 1995; Chen et al., 1996), OBP2 and OBP3 all bind to the same transcriptional regulator, OBF4, but their genes are expressed in distinctive tissues (Kang and Singh, 2000). In tobacco, a Dof protein is the main *trans*-acting factor regulating the *Agrobacterium rhizogenes rolB* oncogene (Baumann et al., 1999).

Employing gene expression analysis tools in fruits of a seedless grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivar, we have previously identified a *Dof*-encoding gene, named *VvDof1*, specifically expressed at the fruit developmental stage defined as four-weeks after fruit set (Costenaro da Silva et al., 2010, submitted). We therefore decided to further investigate the presence of other genes in the grapevine genome potentially encoding Dof proteins. The results of this study are here described demonstrating that 26 *Dof*-encoding genes are present in grapevine. We developed a phylogenetic study comparing grapevine *Dof* genes with their counterparts in two other eudicots completely sequenced, *A. thaliana* and *P. trichocarpa* (Torr. & Gray ex Brayshaw). Finally, the

expression profiles of all 26 *Dof* genes were established by RT-qPCR in nine vegetative and reproductive grapevine organs.

RESULTS

Identification and Annotation of Grapevine *Dof* Genes

We have previously conducted a representational difference analysis (RDA) aimed to the identification of genes whose expressions were specific to the developmental stages of seedless grapevine fruits (Costenaro da Silva et al., 2010, submitted). Among the expressed sequence tags (ESTs) identified, a cDNA encoding a putative Dof-domain protein was isolated in the Developmental Stage known as four-weeks after fruit-set (DS4). Employing the deduced protein sequence of this cDNA, originally named *VvDof1*, we searched the grapevine genome at the Grape Genome Browser (<http://www.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>) and found a total of 26 candidate genes possibly encoding Dof proteins. All *Dof* genes found are listed in Table I, along with their Genoscope locus tag, GenBank accession number, deduced protein length and grapevine chromosomal location. The predicted amino acid sequences of all 26 grapevine Dof domains were aligned as shown in Figure 1 (deduced Dof protein full sequences are presented in FASTA mode in Supplemental Text I) in order to evaluate the evolutionary relationship among them. As expected, all amino acid residues that are known to be highly conserved among the described DNA-binding Dof domains were perfectly mapped in all 26 grapevine *Dof* genes.

Chromosomal Location of *Dof* Genes in the Grapevine Genome

The 26 putative *Dof* genes were found to be distributed in 12 of the 19 grapevine known chromosomes and in one ultracontig whose physical position on specific chromosome(s) have not yet been defined. As shown in Figure 2, three genes are located on chromosomes 8, 10 and 17, two on chromosomes 6 and 18 and one of each is located on chromosomes 1, 2, 3, 9, 13, 14 and 16. Surprisingly, the unknown ultracontig chromosome fragment (ChrUn_random) contains the highest number of *Dof* genes, i.e., six genes. Genoscope annotated scaffolds and molecular markers that help positioning genes and that typically characterize each grapevine chromosome were also represented in Figure 2.

***Dof*-related Electronic PCR**

Two electronic PCR (ePCR) experiments were performed with sequences downloaded from the Genoscope Website, i.e., genomic assembled fragments and predicted mRNA sequences. Based on the aligned sequences, primers flanking the predicted *Dof* domains were manually designed and *in silico* tested in order to avoid cross hybridizations, and employed on both ePCR and RT-qPCR (see Materials and Methods; primer sequences are presented in Supplemental Table I). When employing the predicted Genoscope mRNA sequences as templates, we found amplicons for 17 out of the 26 putative genes, with expected sizes ranging from 107 to 197 bp, with an average size of 165 bp (results not shown). This average is quite close to the expected size of *Dof* domains, i.e., 52-encoded amino acids. When assaying genomic sequences as templates, larger amplicon sizes were found for 25 out of the 26 putative genes, indicating the presence of introns (results not shown).

We could not detect amplification products by ePCR with putative genes *VvDof4*, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 18 and 26 when assaying the Genoscope predicted transcriptome. Since the genome-based ePCR was successful for all these genes but *VvDof6*, it indicates that the current transcriptome annotation from Genoscope is not complete, missing some *Dof* transcripts. The only putative *Dof* gene missing amplification by ePCR against the genomic assembly was *VvDof6*. Interestingly, as shown later, the same primer pair was employed in RT-qPCR and a product of expected size (113 bp) was obtained.

Electronic PCRs of *VvDof7*, *VvDof13* and *VvDof17* resulted in doubled amplification products against the genome assembly. Actually, *VvDof7* is found in two genomic positions in a unknown chromosome: 96,472,204..96,472,081 (Genbank ID: GSVIV00004032001) and 97,105,527..97,105,670 (Genbank ID: DSVIVG00004167001). Primer binding sites between these regions are almost identical, with one single mismatch, resulting in two distinct amplicons of 124 and 144 bp, respectively. Similar ePCR results were found for *VvDof13* and *VvDof17*. Two genomic regions allowed amplifications of *VvDof13*, chr6: 5,455,973..5,456,264 (292 bp) and chr13: 3,094,331...3,094,640 (310 bp). The primer binding sites in chromosome 13 contain two mismatches in the forward primer and one mismatch in the reverse. Designed primers for *VvDof17* allowed the amplification of two contiguous regions of the same amplicon size (137 bp) in chr8: 5,873,438..5,873,574 and chr8: 5,882,037..5,882,173. The region starting at base 5,873,438 contains the gene model

GSVIVT00038908001 encoding for a protein (GSVIVG00038908001) that indeed contains the Dof domain. The region at 5,882,037 does not code for a gene, but a search in this region revealed the existence of a partial Dof domain fragment made up by 16 amino acids.

Phylogenetic Analysis of Predicted Dof Proteins

A phylogenetic analysis was carried out with the 26 predicted grapevine Dof proteins and the sets of 36 and 41 Dof proteins from *A. thaliana* (Yanagisawa, 2002; Lijavetzky et al., 2003) and *P. trichocarpa* (Yang et al., 2006) respectively, in order to evaluate the evolutionary relationships within the three *Dof* gene families. The single *Dof* gene described in the algae *C. reinhardtii* (Moreno-Risueno et al., 2007) was used as outgroup. The identities and genomic references of *Dof* genes from *A. thaliana*, *P. trichocarpa* and *C. reinhardtii* are indicated in Supplemental Table II.

Surprisingly, when trying to use the Dof domain region as the sole input sequence for phylogenetic analysis, we failed to produce trees with an acceptable bootstrap support (results not shown). In order to refine the phylogenetic tree construction, we therefore employed an alternative approach, computing conserved motifs from the unaligned set of sequences using the program MEME (<http://meme.nbcn.net/>). Motifs of up to 200 amino acids were extracted, if present, in at least 10 different sequences. A maximum number of 50 motifs was arbitrarily set in order to facilitate the analysis. The resulting set of 50 sequence blocks (Table II). Were used to set up a manually edited alignment data set provided as input to a Neighbor-Joining tree reconstruction using the program MEGA 4 (Tamura et al., 2007). With such approach, a relatively well supported tree was generated, as shown in Figure 3. The motif distribution of all *Dof*-encoding genes generated according to the MEME program is shown in Figure 4.

The analysis of the complete amino acid sequences of the Dof proteins, using the MEME software, revealed the existence of homologous motifs, conserved among their sequences and different from the Dof binding domain characteristic of this family. As expected, the multiple alignments of the total set of 104 proteins revealed that the Dof spanning region was the only one shared among all sequences. None of the other motifs displayed such a ubiquitous distribution but, as explained above, were fundamental to direct tree convergence. In total, 38 out of the 50 motifs identified were shared by Dof proteins derived from grapevine, poplar and *A. thaliana* (Supplemental Table III). Also

we found species-specific motifs for *A. thaliana* (24, 26 and 33) and poplar (8 and 50). Interestingly, none of the motifs identified were grapevine-specific. Furthermore, only four motifs with *A. thaliana* (32, 39, 44 and 45) and three with poplar (15, 36 and 47).

The set of motifs 24, 26 and 33, found to be specific of Dof proteins from *A. thaliana*, is defined by the group of species-specific paralogous genes AtDOF4.2, AtDOF4.3, AtDOF4.4 and AtDOF4.5. *A. thaliana* and poplar Dof proteins share only one motif (43). The motif 8 was found only once in poplar Dof proteins. A more detailed analysis of this motif revealed a deletion of the first six amino acids of the Dof zinc-finger domain, including the first two typical cysteine residues (CX₂CX₂₁CX₂C). Therefore, based on the definition of the *Dof* gene family, it is highly probable that this specific protein may not be biologically functional.

The topology of the unrooted tree obtained by the Neighbor-Joining algorithm allowed us to identify seven groups of Major Clusters of Orthologous Genes (MCOGs), numbered from I to VII in Figure 3. The MCOGs were further divided into subgroups supported by the boot-straping values and the occurrence of common protein motifs outside the Dof domain, where several motifs were indeed found to be commonly linked (e.g. 29-1-25-31-37-10-38-13, 19-2-23-3, 12-5-1-25 and 46-11-30).

From the phylogenetic tree we identified 18 putative pairs of paralogous genes and 17 putative pairs of orthologs among all genes. Twelve pairs of putative orthologs that included grapevine *Dof* genes were identified (indicated by red brackets in Figure 3), being three with *A. thaliana* (*VvDof1*/AtOBP4; *VvDof12*/AtDOF1.4 and *VvDof9*/AtDOF4.7) and nine with poplar (*VvDof15*/PtDOF3, *VvDof24*/PtDOF21, *VvDof11*/PtDOF30, *VvDof25*/PtDOF37, *VvDof16*/PtDOF9, *VvDof4*/PtDOF27, *VvDof23*/PtDOF10, *VvDof5*/PtDOF2 and *VvDof21*/PtDOF17). Ten *A. thaliana* *Dof* paralogous gene pairs previously identified by Lijavetzki et al. (2003), nine reported by Moreno-Risueno et al. (2007) and six detected by Yang et al. (2006) were also observed and clustered in similar tree positions according to our analysis (Figure 3). Unfortunately, due to the release of the new update of the poplar genome (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html), only seven out of the 41 poplar *Dof* genes described by Yang et al. (2006) preserved their gene model accession number and could be identified in our study. Thus an in depth comparison between phylogenetic results were not possible. Among the seven poplar *Dof* genes reported by Yang et al. (2006) that could be identified in our study (see Supplemental Table II), a pair of paralogs previously reported by those authors could also be identified

(PtDOF24/PtDOF41). Comparing the relative positions of the phylogenetic-related *Dof* genes of poplar and *A. thaliana* in the tree previously described by Yang et al. (2006), we could verify that the same *A. thaliana* and poplar *Dof* genes identified in our study share similar clustering and close tree positions in the MCOGs IV, V, VI and VII. Although different sets of *Dof* genes were used in our analysis and in the phylogenetic studies reported by Moreno-Risueno et al. (2007) and Yanagisawa (2002), tree topologies and corresponding phylogenetic relationships indicated that the majority of the *Dof* proteins analyzed, independently of their origins, could be grouped into seven MCOGs. The tree as well as the MCOGs and subgroup organization were consistent with the *Dof* protein motif alignment produced by means of the MEME software (Table II and Figure 4).

Expression Analysis of *Dof* Genes

Employing primer pairs designed to specifically amplify each of the 26 grapevine sequences putatively encoding *Dof* domains, as explained previously, we performed a series of reverse-transcription (RT-) reactions followed by real-time quantitative PCRs (qPCRs). As summarized in Figure 5, RT-qPCRs were conducted with template RNAs obtained from grapevine roots, buds, shoots, leaves, complete flowers, pre-véraison and véraison fruits, 7 mm-large fruits and tendrils. After several trials of reamplification, we failed to obtain measurable amplicons from only four of the *Dof* genes. Although ePCR employing either genomic or deduced transcriptomic sequences allowed us to prove the efficiency of the designed primers, no amplicons were obtained in RT-qPCR for *VvDof2*, *14*, *21* and *23*. It is tempting to assume that these are genes whose transcripts are only detectable in different organs or developmental conditions different from those here tested or that they may represent pseudogenes.

One unequivocal single peak with the expected size was observed in the RT-qPCR melting curves for all other *Dof* genes, even for *VvDof7* and *13* that, according to the ePCR results, should yield two amplicons each (results not shown). *VvDof6*, whose amplicon was missed by ePCR, produced a single amplicon by RT-qPCR as well. Noticeably, grapevine *Dof* gene expression, based on steady-state mRNA accumulation, was quite diverse, with 13 profiles of expression according to the hierarchic classification generated with the use of the Genesis software (Sturn et al., 2002, release 1.7.5) and Pearson metric correlation tools (horizontally represented in Figure 5). Among the nine organs tested, none of the *Dof* genes seemed to be specific to, or to

have any pronounced level of mRNA accumulation in, tendrils or leaves. On the other hand, six and seven non-redundant *Dof* genes exhibited their highest levels of expressions in shoots (*VvDof5*, 6, 7, 19 and 25) and whole flowers (*VvDof1*, 12, 13, 15, 17, 24 and 26). It is important to mention that flower was the only organ where we failed to have reproducible results for four of the *Dof* genes (*VvDof11*, 16, 18 and 25, represented in gray color in Figure 5, considering our biological triplicates and technical quadruplicates. Buds and véraison fruits were the organs with the highest accumulation of steady-state mRNA from three other non-redundant *Dof* genes each, respectively *VvDof10*, 11 and 18 (buds) and *VvDof3*, 4 and 16 (véraison fruits). One single *Dof* gene exhibited most relevant expression in roots (*VvDof22*), 7 mm-large fruits (*VvDof8*) and pre-véraison fruits (*VvDof9*).

VvDof1, 16, 19 and 22 represented the genes with the most striking specificity of expression in the grapevine organs tested, considering our estimations of steady-state mRNA levels by RT-qPCR. While *VvDof1* exhibited a much pronounced level of expression in flowers than in any other organ, *VvDof16* seemed to be specific to the late stage of berry formation (pre-véraison fruits) and the early stage of berry ripening (véraison fruits). *VvDof19* and 22, in turn, demonstrated a quite high specificity for shoots and roots, respectively.

DISCUSSION

In grape, were identified 62 families of transcription factors in the consensus genome sequence of the heterozygous grapevine *Pinot Noir* and, among them, the *Dof* transcription factors (Velasco et al., 2007). Corroborating those findings, were able to identify, phylogenetically characterize and assess the pattern of gene expression at the steady-state mRNA level of 26 *Dof*-encoding genes in grapevine. Among plant genomes annotated for *Dof*-encoding genes up to date, grapevine and barley have the smaller number with 26 and 24 *Dof* genes, respectively. (Mena et al., 1998; Isabel-LaMoneda et al., 2003). Yanagisawa (2002) described 37 *Dof* genes in *A. thaliana* while Lijavetzky et al. (2003) described at least 30 *Dof* genes in rice and 36 for *A. thaliana*. The number of *Dof* genes observed in poplar was 41 (Yang et al., 2006) and, more recently, Lindsay et al. (2009) identified at least 31 *Dof* genes in wheat.

In the present work, amino acid sequences deduced from all 26 grapevine Dof domains matched perfectly (Figure 1), including the four cysteine residues for zinc coordination and other residues well conserved in Dof transcription factors from *A. thaliana*, rice and other plants, suggesting that all these Dof domains may be functional.

The predicted physical localization of *Dof* genes in grapevine chromosomes was here presented. It was intriguing the fact that six *Dof* genes were positioned into the ultracontig whose localization among grapevine chromosomes is still unclear. Many other important genes have been assigned to the same ultracontig like the MIKC-type MADS box genes (Diaz-Riquelme et al., 2009) among others (Jaillon et al., 2007; Velasco et al., 2007).

The phylogenetic relationships between rice and *A. thaliana* Dof proteins have been previously established (Lijavetzky et al., 2003). Likewise we developed a phylogenetic study in order to identify putative orthologous and paralogous *Dof* genes among *V. vinifera*, *P. trichocarpa* and *A. thaliana*, with complete genomes publically available. Our phylogenetic analysis allowed us to identify clear orthologous pairs among the three species. The only strategy that worked out for the establishment of phylogenetic trees was the use of the Neighbor-Joining method. All other approaches tested (Distance-based, Parsimony and Maximum Likelihood methods) did not provided acceptable support for the trees. As many authors have previously observed (Yanagisawa, 1995; Zhang et al., 1995; De Paolis et al., 1996; Vicente-Carbajosa et al., 1997; Mena et al., 1998, Lijavestky et al., 2003, Yang et al., 2006; Moreno-Risueno et al., 2007), the Dof domain is extremely conserved among proteins and the only strategy that allowed us to generate consistent trees was based on sequences outside the Dof domain. Such strategy was crucial to produce a tree with considerable bootstrapping support for most of the defined groups and subgroups. Lijavetzky et al. (2003) recognized that in their phylogenetic analysis several clusters remained with poor supporting values as consequence of performing the study with a 50 amino acid-length sequence, a constraint imposed by the lack of sequence conservation among Dof proteins outside this domain. These authors made it worth to mention that most of the groups and subgroups defined were supported by additional criteria, such as gene structure and the presence of common protein motifs outside the Dof domain detected in their MEME analysis (Lijavetzky et al., 2003).

As one could expect from a comparative genomic analysis among dicot species, the number of orthologous *Dof* genes found among grapevine, poplar and *A. thaliana*

(17) was higher than between *A. thaliana* and the rice monocot (only seven; Lijavetzky et al. 2003), even considering that rice harbors four more *Dof* genes than grapevine. Orthologous genes are defined as genes in different genomes that have been created by the splitting of taxonomic lineages, and paralogs as genes in the same genome created by duplication events (Thornton et al., 2000). Orthologs usually keep similar functions and paralogous genes are normally associated to different roles (Tatusov et al., 1997). Distinguishing orthologous from paralogous genes is essential to comparative genomics. Indeed, the fundamental activity of comparative genomics is to track the presence, structural characteristics, function, and map position of orthologs in multiple genomes (Thornton et al., 2000). Our phylogenetic study indicated an overall distribution within the MCOGs of the putative orthologous *Dof* genes that may exert similar basic functions in these three eudicots or *A. thaliana*, poplar and grape.

As reported for other protein families (Pinyopich et al. 2003) the establishment of new gene functions by duplication events contributes to the evolutionary diversification of genomes and is a source of evolutionary novelty (Gilbert et al. 1997). The Ohno's classic model (Ohno 1970) concerning the fate of duplicated genes and the duplication–degeneration–complementation (DDC) model, predict for each one of the duplicates the gain of a new function (neofunctionalization), its loss (pseudogenization) or the development of overlapping redundant functions and expression patterns (subfunctionalization; Force et al. 1999; Lynch and Force 2000). Moreno-Risueno et al. (2007) already suggested that duplications of an ancestral *Dof*, probably formed in a photosynthetic eukaryotic ancestor, followed by subsequent neo-, subfunctionalization and pseudogenization processes would have triggered the expansion of the family. Loss, acquisition and shuffling of conserved motifs among the new *Dof* sequences likely underline the mechanism of formation of the distinct clusters (subfamilies) of phylogenetically related *Dof* genes. Taking this hypothesis into account, when comparing multi-gene families among different species, it is a common event to find groups of genes that are collectively orthologous, indicating gene duplications during evolution. In this situation, knowledge of gene function of certain members allows the confirmation of paralogous and orthologous relationships, otherwise difficult to infer merely from tree topologies. This seems to be the case of many *Dof* genes among *A. thaliana*, poplar and grapevine like PtDOF38, PtDOF40, *VvDof19* and *VvDof20* in the MCOG VII, *VvDof14*, *VvDof15*, PtDOF4 and PtDOF8 in the MCOG I, *VvDof6*, *VvDof7*, PtDOF22 and PtDOF39 in the MCOG VI (Figure 3). These genes display a

high degree of sequence similarity with nearly identical patterns of protein motif distribution. In the case of grapevine pairs of paralogs *VvDof6-VvDof7* and *VvDof19-VvDof20*, both pairs have very similar patterns of gene expression, with a peak at the shoot growth stage of development, an indication of diversification through subfunctionalization. On the other hand, a pseudogenization might be occurring in the pair of paralogous genes *VvDof14-VvDof15*, since despite of our attempts, no expression was detected in any tissue tested for *VvDof14*. A pair of *A. thaliana* paralogous genes named AtOBP1 and AtDOF5.8 is close to *VvDof6* and *VvDof7* in the MCOG VI. AtOBP1 and AtDOF5.8 were shown to be important as regulators of *A. thaliana* growth and development, being expressed mainly at the stage known as 1-5 rosette leaves (Chawade et al., 2007; Moreno-Risueno et al., 2007; Skirycz et al., 2008).

As shown in Figure 4, besides the Dof domain, a plethora of other motifs is shared among Dof proteins. It is exactly the presence, absence and position of these different motifs that may render the functional relevance of each Dof factor. This is of particular relevance when discussing the putative biological function of these proteins. Considering the case described above, the phylogenetic relationship observed for these genes may reflect their conserved gene function. Thus it is tempting to speculate that *VvDof6*, *VvDof7* and the *A. thaliana* AtOBP1 and AtDOF5.8 for example, may share similar functions during growth and development. Although a considerable and extensive annotation work has been done in *A. thaliana* since the release of its sequenced genome (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) little is known about the functions of the Dof family of transcription factors in this species. We expected that the *A. thaliana* orthologs already characterized could indicate a function for the putative grapevine counterpart or confirm its pattern of expression in different tissues. Unfortunately, among the three representative *Dof* orthologous genes found between grapevine and *A. thaliana*, none included one of the better characterized transcription factors from *A. thaliana* like COG1, DAG1/DAG2, HPPBF, OBP1-3, HCA2, CDF1-5 (reviewed in Yanagisawa, 2002 and 2004; Gualberti et al., 2002; Kang et al., 2003; Lijavetzky et al., 2003; Ward et al., 2005; Skirycz et al., 2006 and 2008; Fornara et al., 2009; Gabriele et al., 2009; Guo et al., 2009). However it is worth to note that the *A. thaliana* CDF1-5 series of *Dof* genes recently reported to be essential in conferring a photoperiodic flowering response by repressing CONSTANS transcription, cluster together in the MCOG VII. Coincidentally, five grapevine *Dof* genes (*VvDof18-22*) of similar protein motif structure cluster in the same MCOG VII, sharing close tree

positions which, in fact, may turn them good candidates putatively associated with similar functional activity in grapes.

Hence considering the large number of *Dof* genes that are grouped in each cluster, and the relative few data about their functions, it is rash to assume similar functions for grapevine orthologous. The steady-state mRNA accumulation of each gene measured by RT-qPCR is the only information we have about their specificity of expression, as a start towards the definition of their functions and the preliminary association of these genes with specific grapevine developmental processes.

In conclusion, we identified the probable full set of *Dof* genes in grapevine. The phylogenetic analysis, employing the complete set of *Dof* genes of the three eudicots whose genome was complete sequenced, resulted in the identification of seven major clusters of orthologous genes that contains members belonging to the three species. Our results confirm that recurrent duplications and diversification of an original *Dof* ancestor seem to have led to the formation of this complex family of transcription factors specific to Viridiplantae. In view of important genome duplication events leading to gene redundancy in the history of plant diversification (see Jaillon et al. 2007 for example), a combination of phylogenetically inferred relationships with functional data will be essential to effectively establish conserved and diverged roles of the *Dof* gene family in grapevine and in other plant species.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Grapevine (*Vitis vinifera* L. cultivar *Pinot Noir* grafted on Paulsen 1103) samples were obtained from experimental plots at Embrapa Uva e Vinho (Bento Gonçalves, RS, Brazil). Samples were collected from at least seven independent plants. On each data point, biological triplicates corresponded to samples of tissues of three independent plants kept separately throughout the analysis. All samples were frozen in liquid nitrogen in the field and stored at -80 °C until the RNA extraction. Expression analyses were performed on plant organs collected at different developmental stages during the 2008/2009 growing season following the grapevine growth stages described by Coombe, 1995 (modified E-L system) except when indicated. Organs selected for gene expression analysis corresponded to roots (of *in vitro* cultivated plants), 5cm diameter

leaves, tips of 10 cm shoots (E-L # 12.), complete flowers (pre-anthesis E-L # 17), 7 mm-large fruits (E-L # 31), summer buds (sampled at E-L # 31), pre-véraison fruits (E-L # 34-35), véraison fruits (E-L # 34-35), and tendrils (sampled at pre-anthesis E-L # 17). Pre-véraison and véraison berries were sampled from the same bunch by separating half-colored berries from green colored berries.

Database Search and Primer Design for ePCR and RT-qPCR

A genome-wide search for putative Dof domains was performed using the program HMMER (<http://hmmer.janelia.org/>) against the predicted protein set derived from the grapevine genome available at the Genoscope Genome Browser (<http://www.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>) using the Dof domain HMM model taken from Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), with the accession number PF02701. Genomic sequences relative to Dof-containing proteins were extracted from the Genoscope and primer pairs were designed using the program Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) using an amplicon length constraint in the range of 100 to 250 bp. To ascertain uniqueness of amplification, an electronic PCR (ePCR) using the program PrimerMatch (http://edwardslab.bmcg.georgetown.edu/software/primer_match.html) was performed using the generated primer pairs against the reference genome from Grape Genome Browser.

Our collection of non-redundant *A. thaliana* Dof proteins was gathered from two different and interconnected sources: the Munich Information Center for Protein Sequences database (MIPS, MATdb, <http://mips.gsf.de/proj/thal/db>), the Institute for Genomic Research, (TIGRdb, <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/index.shtml>) and the Regulatory Gene Initiative on *A. thaliana* (REGIA) European project. In order to obtain the *P. trichocarpa* Dof gene sequences, *A. thaliana* and grapevine Dof protein sequences were used to search the *P. trichocarpa* Genome Annotation (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>) using tBLASTn.

Chromosomal Location of Grapevine Dof Genes

The positioning of *VvDof* genes in grapevine chromosomes was obtained using the BLAT server and additional physical localization tools at the Genoscope Genome

Browser and available information at NCBI from the IASMA sequencing project (Jaillon et al., 2007; Velasco et al., 2007).

Phylogenetic Analysis

Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using the MEGA program, version 4 (Tamura et al., 2007). To generate phylogenetic trees, complete Dof-type predicted proteins of *A. thaliana*, poplar, grapevine and *C. reinhardtii* were aligned in the Multalin server (Corpet, 1988). The Neighbor-Joining method was used to construct different trees. To estimate evolutionary distances, the proportions of amino acid differences were computed using amino acid p-distances. To handle gaps and missing data, the pair-wise deletion option was used. Reliability of the obtained trees was tested using bootstrapping with 100 replicates. Protein motifs of the *Dof* genes were identified statistically using the MEME software (Bailey and Elkan, 1994) with motif length set from 10 to 200, motif sites from 2 to 100, and *e* value lower than 10^{-10} .

Gene Expression Analysis

Total RNA was extracted from frozen tissues using the Purelink RNA Reagent (Invitrogen) and protocols recommended by the manufacturer. All RNA preparations were treated with DNase (Fermentas) in order to eliminate residual DNA contaminations. Quantity and quality of total RNAs were evaluated with the Qubit Quantitation Platform (Invitrogen) and standard 1.5% agarose gel electrophoresis in 1X MOPS buffer. Complementary DNA was prepared using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) and 50 pmol of oligo dT primer. First-strand cDNA synthesis was performed using 2 μ g of total RNA previously treated with DNase I (Promega) for residual DNA contamination. Transcript levels were determined by RT-qPCR using a StepOne Plus PCR system (Applied Biosystems) and SYBR Green (Applied Biosystems). Reactions were performed in a final volume of 20 μ L with 10 μ M forward and reverse specific primers and 1:100 dilution of cDNAs. After enzyme activation at 95 °C for 5 minutes, amplification was carried out in a four-step PCR procedure with 40 cycles of 15 seconds at 95 °C for denaturation and 35 seconds at 60 °C for annealing/extension. Gene primer sequences used in the RT-qPCR analyses are listed in Supplemental Table I. No-template controls were included for each primer pair, and each PCR was performed in triplicates. Data were analyzed using the StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems). Dissociation curves for each amplicon were analyzed to

verify the specificity of each amplification reaction; the dissociation curve was obtained by heating the amplicon from 60 °C to 95 °C. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and tubulin (Reid et al., 2006) gene sequences were used as internal controls (reference genes) to normalize the amount of mRNA present in each sample, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method described by Livak and Schmittgen (2001). Relative data of gene expression with respect to control genes were gene-wise normalized using the Genesis software (Sturn et al., 2002). Hierarchical clustering of gene expression data was performed using the Pearson correlation tool.

LITERATURE CITED

Bailey TL, Elkan C (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 2: 28-36

Baumann K, De Paolis A, Costantino P, Gualberti G (1999) The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the *rolB* oncogene in plants. Plant Cell 11: 323-333

Chawade A, Bräutigam M, Lindlöf A, Olsson O, Olsson B (2007) Putative cold acclimation pathways in *Arabidopsis thaliana* identified by a combined analysis of mRNA co-expression patterns, promoter motifs and transcription factors. BMC Genomics 8:304

Chen W, Chao G, Singh KB (1996) The promoter of an H₂O₂-inducible, *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF and OBP1-binding sites. Plant J. 10: 955-966

Coombe BG (1995) Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. Aust. J. Grape Wine Res. 1:100-110

Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. 16: 10881-10890

Costenaro da Silva D, Henriques JAP, Margis R, Pasquali G, Revers LF (2010, submitted) Identification and expression analysis of genes associated with the early berry development in the seedless grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar Sultanina. Plant Cell Rep.

De Paolis A, Sabatini S, De Pascalis L, Costantino P, Capone I (1996) A *rolB* regulatory factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins. Plant J. 10: 215-223

Diaz-Riquelme J, Lijavetzky D, Martínez-Zapater JM, Carmona MJ (2009) Genome-wide analysis of MIKCC-type MADS box genes in grapevine. *Plant Physiol.* 149: 354-369

Duarte JM, Cui L, Wall PK, Zhang Q, Zhang X, L-M Jim, Ma H, Altman N, dePamphilis CW (2006) Expression Pattern Shifts Following Duplication Indicative of Subfunctionalization and Neofunctionalization in Regulatory Genes of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evol.* 23(2):469-478

Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151:1531-1545

Fornara F, Panigrahi KC, Gissot L, Sauerbrunn N, Rühl M, Jarillo JA, Coupland G (2009) *Arabidopsis thaliana* DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Dev. Cell* 17(1): 75-86

Gabriele S, Rizza A, Martone J, Circelli P, Costantino P, Vittorioso P (2009) The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene AtGA3ox1. *Plant J.*1365-313X

Gilbert W, de Souza SJ, Long M (1997) Origin of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94:7698-7703

Gualberti G, Papi M, Bellucci L, Ricci I, Bouchez D, Camilleri C, Costantino P, Vittorioso P (2002) Mutations in the Dof zinc finger genes DAG2 and DAG1 influence with opposite effects the germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* 14: 1253-1263

Guo Y, Qin G, Gu H, Qu LJ (2009) Dof5.6/HCA2, a Dof transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 10.1105/tpc.108.064139

Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA, Kay SA (2005) FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 309: 293-297

Isabel-LaMoneda I, Diaz I, Martinez M, Mena M, Carbonero P (2003) SAD: a new DOF protein from barley that activates transcription of a cathepsin B-like thiol protease gene in the aleurone of germinating seeds. *Plant J.* 33: 329-340

Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Huguene P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pè ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quétier F, Wincker P (2007) The

grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463-467

Kang HG, Foley RC, Oñate-Sánchez L, Lin C, Singh KB (2003) Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. *Plant J.* 35: 362-372

Kang HG, Singh KB (2000) Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis thaliana* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *Plant J.* 21: 329-339

Kisu Y, Ono T, Shimofurutani N, Suzuki M, Esaka M (1998) Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. *Plant Cell Physiol.* 39: 1054-1064

Lijavetzky D, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J (2003) Genome wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis thaliana* Dof gene families. *BMC Evol. Biol.* 3: 17

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402-408

Lynch M, Force A (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154:459-473

Mena M, Cejudo FJ, Isabel-Lamoneda I, Carbonero P (2002) A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of Gibberellin-responsive genes in Barley aleurone. *Plant Physiol.* 130: 111-119

Mena M, Vicente-Carbajosa J, Schmidt R, Carbonero P (1998) An endosperm-specific Dof protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm. *Plant J.* 16: 53-62

Moreno-Risueno MA, Martinez M, Vicente-Carbajosa J, Carbonero P (2007) The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. *Mol. Genet. Genomics* 277: 379-390

Ohno S (1970) *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag, New York.

Papi M, Sabatini S, Bouchez D, Camilleri C, Costantino P, Vittorioso P (2000) Identification and disruption of an *Arabidopsis thaliana* zinc finger gene controlling seed germination. *Genes Dev.* 14: 28-33

Papi M, Sabatini S, Altamura MM, Hennig L, Schafer E, Costantino P, Vittorioso P (2002) Inactivation of the phloem-specific Dof zinc finger gene DAG1 affects response to light and integrity of the testa of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiol.* 128: 411-417

- Park DH, Lim PO, Kim JS, Cho DS, Hong SH, Nam HG (2003) The *Arabidopsis thaliana* COG1 gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *Plant J.* 34: 161-171
- Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424:85-88
- Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B (2001) Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant J.* 28: 455-464
- Reid KE, Olsson N, Scholossen J, Peng F, Lund ST (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* 6: 27
- Shaw LM, McIntyre CL, Gresshoff PM, Xue G-P (2009) Members of the Dof transcription factor family in *Triticum aestivum* are associated with light-mediated gene regulation. *Funct. Integr. Genomics.* DOI 10.1007/s10142-009-0130-2
- Skirycz A, Reichelt M, Burow M, Birkemeyer C, Rolcik J, Kopka J, Zanon MI, Gershenzon J, Strnad M, Szopa J, Mueller-Roeber B, Witt I (2006) DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 47:10-24
- Skirycz A, Radziejowski A, Busch W, Hannah MA, Czeszejko J, Kwaśniewski M, Zanon MI, Lohmann JU, De Veylder L, Witt I, Mueller-Roeber B (2008) The DOF transcription factor OBP1 is involved in cell cycle regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 56:779-792
- Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18: 207-208
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599
- Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* 278: 631-637
- The Arabidopsis Genome Initiative (2001) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 414: 845-850
- Thornton JW, DeSalle R (2000) Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1: 41-73
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE*, 2 (12): e1326

Vicente-Carbajosa J, Moose SP, Parsons RL, Schmidt RJ (1997) A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 7685-7690

Ward JM, Cufu CA, Denzel MA, Neff MM (2005) The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17: 475-485

Washio K (2001) Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin expression of a peptidase gene following the germination of rice grains. *Biochim. Biophys. Acta* 1520: 54-62

Yanagisawa S (1995) A novel DNA binding domain that may form a single zinc finger motif. *Nucleic Acid Res.* 23: 3403-3410

Yanagisawa S (2000) Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J.* 21: 281-288

Yanagisawa S (2002) The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 7: 555-560

Yanagisawa S (2004) Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant Cell Physiol.* 45: 386-391

Yanagisawa S, Izui K (1993) Molecular cloning of two DNA binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same specific motif. *J. Biol. Chem.* 268: 16028-16036

Yanagisawa S, Sheen J (1998) Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell* 10: 75-89

Yang X, Tuskan GA, Cheng MZ (2006) Divergence of the Dof gene families in poplar, *Arabidopsis thaliana*, and rice suggests multiple modes of gene evolution after duplication. *Plant Physiol.* 142: 820-30

Zhang B, Chen W, Foley R, Büttner M, Singh K (1995) Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to *ocs* element promoter sequences. *Plant Cell* 7: 2241-2252

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Multiple sequence alignment of the 26 Dof domain sequences predicted from the grapevine genome. Gene names correspond to those listed in Table I. Cysteine residues putatively critical for the zinc-finger structure are marked in yellow. Identical residues in all sequences are indicated by (*) under the column, conserved substitutions are indicated by (:), and semi-conserved substitutions are indicated by (·).

Figure 2. Chromosomal locations of grapevine *Dof* genes. Paralogous regions in the putative ancestral constituents of the grapevine genome are depicted in the same color following Jaillón et al. (2007). Molecular markers and scaffolds that help positioning genes are listed in bold and italics, respectively. The ChrUn_random correspond to an ultracontig sequence that is still not assigned to a specific physical position.

Figure 3. Phylogenetic tree of the *Dof* gene family members from *V. vinifera*, *A. thaliana*, *P. trichocarpa* and *C. reinhardtii*. The resulting major clusters of orthologous genes (MCOGs) are shown on the right and numbered from I to VII. Grapevine pairs of orthologous genes are indicated by red brackets and clusters of Dof-deduced proteins with highly conserved motif structures are indicated by green brackets. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The optimal tree with the sum of branch length (= 32.63503723) is shown. The confidence probability (multiplied by 100) that the interior branch length is greater than zero, as estimated using the bootstrap test (100 replicates) is shown above branches. The evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing alignment gaps and missing data were eliminated only in pairwise sequence comparisons (Pairwise deletion option). There were a total of 683 positions in the final dataset. Phylogenetic analyses were conducted using the MEGA 4 program.

Figure 4. Schematic representation of conserved motifs of the Dof proteins from *A. thaliana*, *C. reinhardtii*, *Vitis* and *Populus*. Motifs were identified by means of the MEME software using the complete amino acid sequences of the 36 *A. thaliana* *Dof* genes (Lijavetzky et al., 2003), 26 grapevine *Dof* genes listed in Supplement 1, the single *Dof* gene from *C. reinhardtii* and 41 *Populus* *Dof* genes (Yang et al., 2006). Positions of

the identified motifs are relative to the Dof domain. Multilevel consensus sequences for the MEME defined motifs are listed in Table II.

Figure 5. Expression profiles of *Dof* genes in nine grapevine vegetative and reproductive organs. Steady-state mRNA levels related to the putative grapevine *Dof* genes were estimated by RT-qPCR and normalized with GAPDH and Tubulin reference genes. Relative gene expression data were gene-wise normalized with the use of the Genesis software (release 1.7.5, Sturn et al., 2002). White spots indicate the organ where the maximum absolute level of expression for each gene was measured. The hierarchical clustering analysis was performed using the Pearson correlation tool. Color scales, representing signal values, are shown on top.

Table I. Grapevine *Dof* genes. For every gene, the respective locus tag, accession number, protein length, chromosomal location are listed. Genes in random chromosomes (chr_r) are indicated with the respective chromosome number but without known relative position. The term “chrUn_r” refers to genes that are not yet located on chromosomes.

Gene Name	Locus tag (Domain)	Nucleotide accession	Protein length	Chromosome location
<i>VvDof1</i>	GSVIVT00017546001	XM_002267056	271	chr17 from 5228488 to 5229363 strand +
<i>VvDof2</i>	GSVIVT00006675001	XM_002262667	201	chr2 from 1848879 to 1850348 strand +
<i>VvDof3</i>	GSVIVT00008647001	AM478502	300	chrUn_r from 51333158 to 51334515 strand +
<i>VvDof4</i>	GSVIVT00016092001	XM_002279586	309	chr17 from 9471212 to 9473337 strand -
<i>VvDof5</i>	GSVIVT00024470001	AM449873	287	chr6 from 4248209 to 4249479 strand -
<i>VvDof6</i>	GSVIVT00004167001	AM430014	221	chrU_r from 97104852 to 97106132 strand +
<i>VvDof7</i>	GSVIVT00004032001	AM430014	233	chrU_r from 96471620 to 964727988 strand -
<i>VvDof8</i>	GSVIVT00014741001	XM_002284072	227	chr18 from 9515274 to 9516412 strand -
<i>VvDof9</i>	GSVIVT00036500001	XM_002281578	174	chr3 from 4627449 to 46279470 strand +
<i>VvDof10</i>	GSVIVT00034203001	AM476036	217	chr9 from 2242323 to 2243792 strand +
<i>VvDof11</i>	GSVIVT00011635001	XM_002266482	278	chrUn_r from 69648428 to 69649447 strand -
<i>VvDof12</i>	GSVIVT00003072001	AM444932	337	chr10 from 146990 to 149045 strand -
<i>VvDof13</i>	GSVIVT00024349001	XM_002281108	257	chr6 from 5455938 to 5457091 strand +
<i>VvDof14</i>	GSVIVT00018482001	XM_002278606	339	chr13 from 3093501 to 3094738 strand -
<i>VvDof15</i>	GSVIVT00021306001	XM_002269995	328	chr8 from 13520806 to 135227568 strand +
<i>VvDof16</i>	GSVIVT00014273001	AM430517	357	chr18 from 13692185 to 13693255 strand -
<i>VvDof17</i>	GSVIVT00038908001	XM_002265454	256	chr8 from 5873143 to 5873955 strand +
<i>VvDof18</i>	GSVIVT00020987001	AM451633	269	chr14 from 18804490 to 18807679 strand +
<i>VvDof19</i>	GSVIVT00016324001	XM_002281958	368	chr17 from 6961001 to 6963645 strand +
<i>VvDof20</i>	GSVIVT00036946001	XM_002269425	386	chr1_r from 1589784 to 1592637 strand -
<i>VvDof21</i>	GSVIVT00003807001	XM_002275091	421	chr8 from 1953168 to 1954430 strand -
<i>VvDof22</i>	GSVIVT00035876001	AM486598	160	chr10 from 1438024 to 1438503 strand -
<i>VvDof23</i>	GSVIVT00037222001	XM_002275544	262	chr16 from 7752590 to 7754001 strand -
<i>VvDof24</i>	GSVIVT00003074001	AM431127	300	chr10 from 129059 to 130699 strand +
<i>VvDof25</i>	GSVIVT00003895001	XM_002267942	227	chrUn_r from 88415353 to 88416033 strand +
<i>VvDof26</i>	GSVIVT00010280001	AM481122	296	chrUn_r from 63391732 to 63392807 strand +

Table II. Conserved motifs of known grapevine, poplar and *A. thaliana* Dof proteins employed in the phylogenetic studies.

Motif number ^a	Protein length	Motif with best possible match ^b
1	50	CPRCDSTNTKFCYYNNYNLSQPRHFCKTCRRYWTGGALRNVPVGGGCRK
2	37	EEEKTEKCVWVPKTLRIDDPNEAAKSSIWATLGIKND
3	26	KNHVAETSPVLQANPAALSRLNFHE
4	14	MQEKAIKKFKDIIP
5	36	PPPHVHGSGGAGSIRPGSMADRARLAKIPLPEAALK
6	32	QWWSPIPPAFCPGFPMPFYAPAYWGCTVP
7	14	PVIERKARPQKDQA
8	46	LNTKFCYYNNYNLSQPRHFCKTCRRYWTEGGTLRNVPVGGGRRKNK
9	35	GHLPPQIPQLPFMPPLHHLADYGAGDIGLNFGGIQ
10	35	GFLALGGFGLGLPGFEDMGFGLGRGVWPFPGVGD
11	35	MISSSGVSQLAAVKMEENQGLNLSRQFLGIPGNDQ
12	22	MVFSSIPVYLDHDDWQQQNHQ
13	19	GDCFAWPDLAISTPGNGLK
14	26	NGTVLTFGSDAPLCESMASVLNLAEK
15	60	MEDSTITTIMPSTSSITITQPWQVPNTSSGMDMTNYWNWDDIENYVSTDNLNVPWDDSEIKP
16	18	NKHSASHYRHITISEALQ
17	18	NPKIHEGQDLNLAFPAMQ
18	25	GIMESNGRLLFPFEDLKQLVSTTEE
19	11	SPTLGKHSRDE
20	14	STGYWNGMFGGGSW
21	14	CYPVVPWPYPWNPA
22	13	HWRLQQQQFPFL
23	19	KKDPISGGGIFKAFESKAE
24	36	FRPMHRLDFHDESFEQDYDVGSDDLIVNPQIGQYI
25	14	NKRSKSSSSSSSS
26	62	KRARVNQPSVAQMVSVEIQPGNHQPFNVQENNDVGSFGASSATVAAGVGNHFGYLYDIHG
27	19	MDNANVFANEDNQVNDVKP
28	19	GFPLQEFKPTLSFFLDGLG
29	13	HQMGAFPPEQEHL
30	14	YWGGNAWTDLSGYN
31	25	EPLPATPVLVPLTANHATSMHFVGD
32	10	RVLWGFQWQM
33	19	MDQYKWTQGFQEMMNMYM
34	33	EDGVSPVASEEDKDPDATSGTSENPKTPSIEKE
35	15	ELLRTGIASRGLNSF
36	30	LSDILYQAMINPPSSVLQQNSISCNFDTK
37	14	ICGSFTSLLNTQGP
38	15	HTALIGNTWQFEGGE

39	11	MQDHHHHMHM
40	14	LPDLNPPILFHFSI
41	39	VQWCSRPLAVPGFCPPNIPLQFVPPSYWGCMPIWGAGT
42	10	QQQQQQQPQ
43	50	HKPEAVRIPVSYGGGENDDHSNGSSVTVSNSIDEAGKSMSKESAMQNCQ
44	13	GHVDEIDSGREIW
45	27	AAAAAHGGFRHDFPMKRLRCYTDGQSC
46	14	FDPPMGLYPFEGEG
47	14	RVHAMNGVHHPSLK
48	10	QPHHHQNHQH
49	33	ENQVQKQPIMFENLEISKPEVCAVGNSRKEGA
50	19	KRDHGEEDIEADDKDSVEK

^aNumbers correspond to the motifs presented in Figure 4.

^bSequences obtained from the analysis of the 104 grapevine, poplar, *A. thaliana* and *C. reinhardtii* DoF complete proteins with the MEME software.

ORIGINAL FIGURE FILES

Figure 1

```

-----Zinc Finger-----
VvDo£16 -APSCPRCSSPNTKFCYNNYLSQPRYFCKGCRRYWTKGGSLRNVPVGGGCRKNRRGKA
VvDo£17 -SPNCPRCGSSNTKFCYNNYLSQPRYFCKGCRRYWTKGGSLRNVPVGGGCRKNRRGKS
VvDo£26 EPLKCPRCDSNTKFCYFNNYKLSQPRHFCKSKRHWTKGGTLRNVPVGGG-RKNKRPKT
VvDo£4 -ALKCPRCDSHTKFCYNNYLSQPRYFCKTCRRYWTKGGTLRNIPVGGGCRKNKKVAS
VvDo£12 -ALKCPRCDSNTKFCYNNYLSQPRHFCKACRRYWTKGGTLRNVPVGGGCRKNKRVKR
VvDo£5 -ALKCPRCDSNTKFCYNNYLSQPRYFCKSCRRYWTKGGTLRNVPVGGGCRKNKRSSS
VvDo£24 ---KCPRCDSINTKFCYNNYLSQPRYFCKTCRRYWTQGGTLRNVPVGGGCRKTKRKPS
VvDo£11 -VLKCPRCDSNTKFCYNNYLSQPRHFCKTCRRYWTKGGALRNVPVGGGCRKNKKIK-
VvDo£1 -ALKCPRCESLNTKFCYNNYLSQPRHFCKSCRRYWTKGGVLRNVPVGGGCRKTKRKA
VvDo£3 -AVNCPRCSSNTKFCYNNYLSQPRYFCKTCRRYWTQGGTLRNVPVGGGSRKNKRSIT
VvDo£2 -ALNCPRCNSTNTKFCYNNYLSQPRYFCKACRRYWTEGGSLRNIPVGGG-----
VvDo£23 -ALNCPRCNSTNTKFCYNNYLSQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNVPVGGGSRKNKRSTS
VvDo£9 HHLQCPRCNSTNTKFCYNNYLSQPRHFCKSCRRYWTHGGALRDIPARDNAPKRSR-
VvDo£13 -ALKCPRCESNTKFCYFNNYLSQPRHFCKTCRRYWTRGGALRNVPVGGGCRKNKSKS
VvDo£15 -ALKCPRCESNTKFCYFNNYLSQPRHFCKTCRRYWTRGGALRNVPVGGGCRKNKSKG
VvDo£14 -ALKCPRCESNTKFCYFNNYLSQPRHFCKACRRYWTRGGALRNVPVGGGCRKNKSKG
VvDo£8 -HLCPCRCDSNTKFCYNNYLSQPRHFCKSCRRYWTQGGTLRNIPVGGGTRKNKRSR
VvDo£6 -HLCPCRCDSNTKFCYNNYNSQPRHFCKSCRRYWTHGGTLRDIPVGGGSRKNKRSR
VvDo£7 -HLCPCRCDSNTKFCYNNYNSQPRHFCKSCRRYWTHGGTLRDIPVGGGSRKNKRSR
VvDo£10 -HLKCPRCESNTKFCYNNYLSQPRHFCKNCRRYWTKGGALRNIPVGGGSRKNKRS
VvDo£25 -NLRCPRCDSNTKFCYNNYLSQPRHFCKTCRRYWTKGGALRNVPVGGGCRKNKNTS-
VvDo£22 -IIPCPRCKSMETKFCYFNNYVNQPRHFCKGCQRYWTAGGALRNVPVGGGRRKSK----
VvDo£21 -ILPCPRCNSLETKFCYFNNYVNQPRHFCKNCQRYWTAGGTMRNVPVGGGRRKNKHLAS
VvDo£19 -ILPCPRCNSMDTKFCYNNYINQPRHFCKSCQRYWTAGGTMRNVPVGGGRRKNKNSAS
VvDo£18 -ILPCPRCNSMDTKFCYNNYVNQPRHFCKNCQRYWTAGGTMRNVPVGGGRRKNKNS
VvDo£20 -ILPCPRCNSMDTKFCYNNYVNQPRHFCKNCQRYWTAGGTMRNVPVGGGRRKNKNSA
*** * *****:***. .***:*** *.*:** ** :*:*.

```

Figure 2

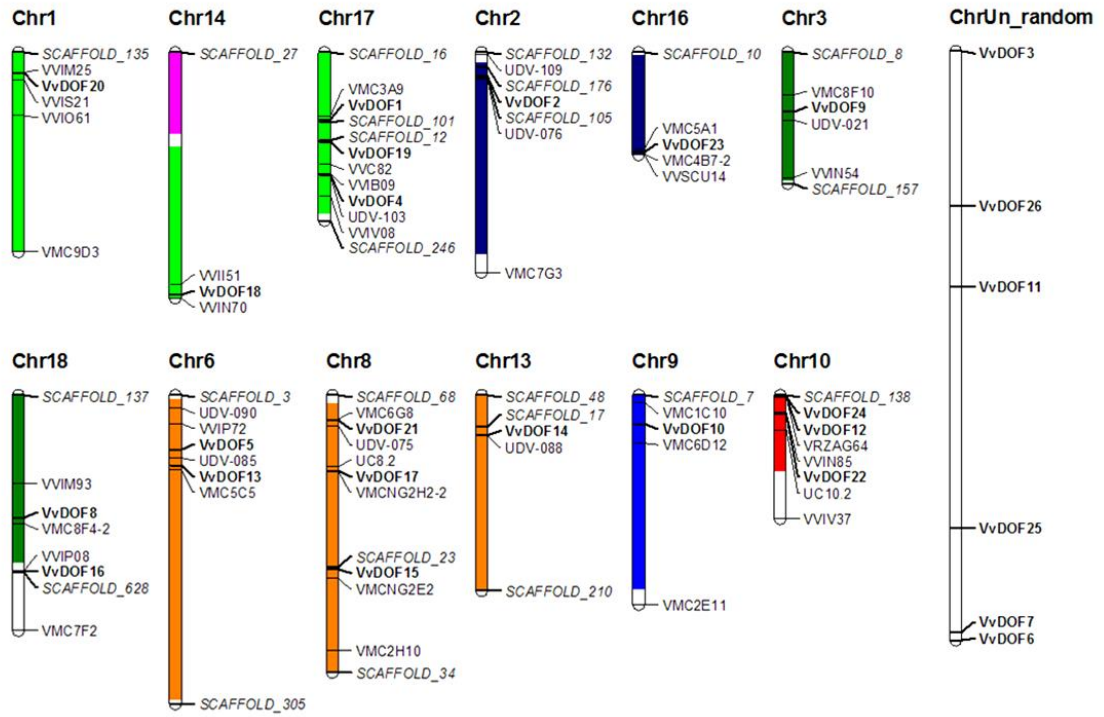


Figure 3

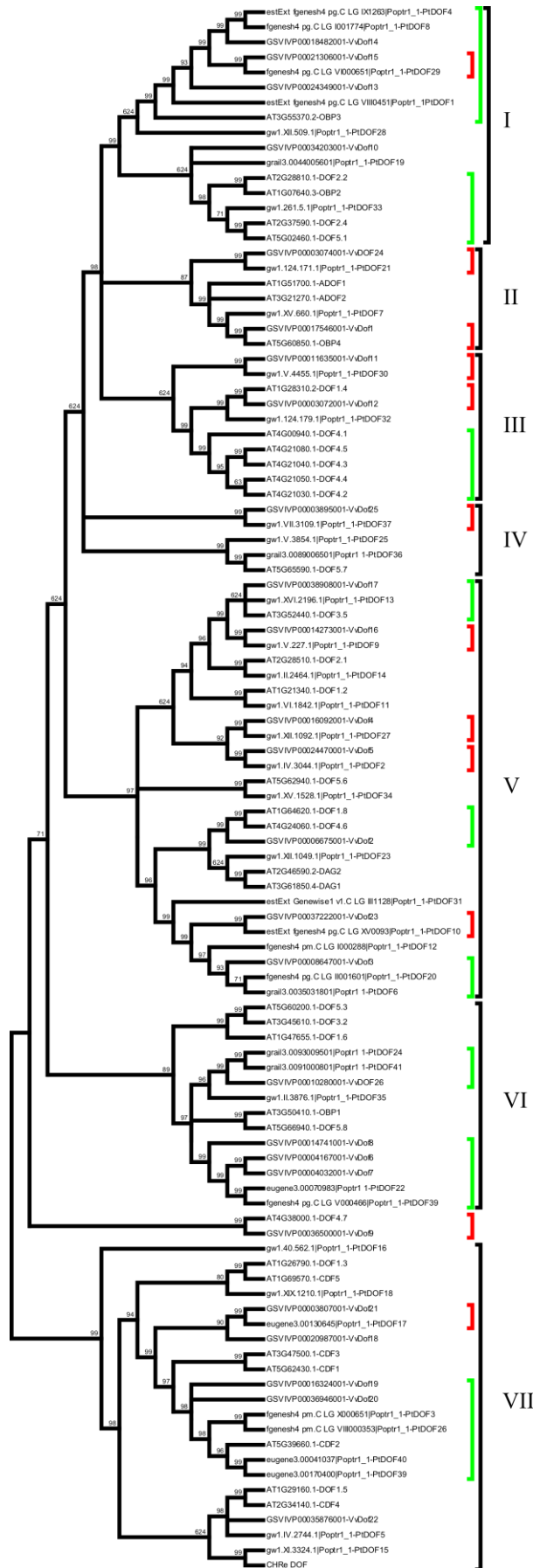


Figure 4

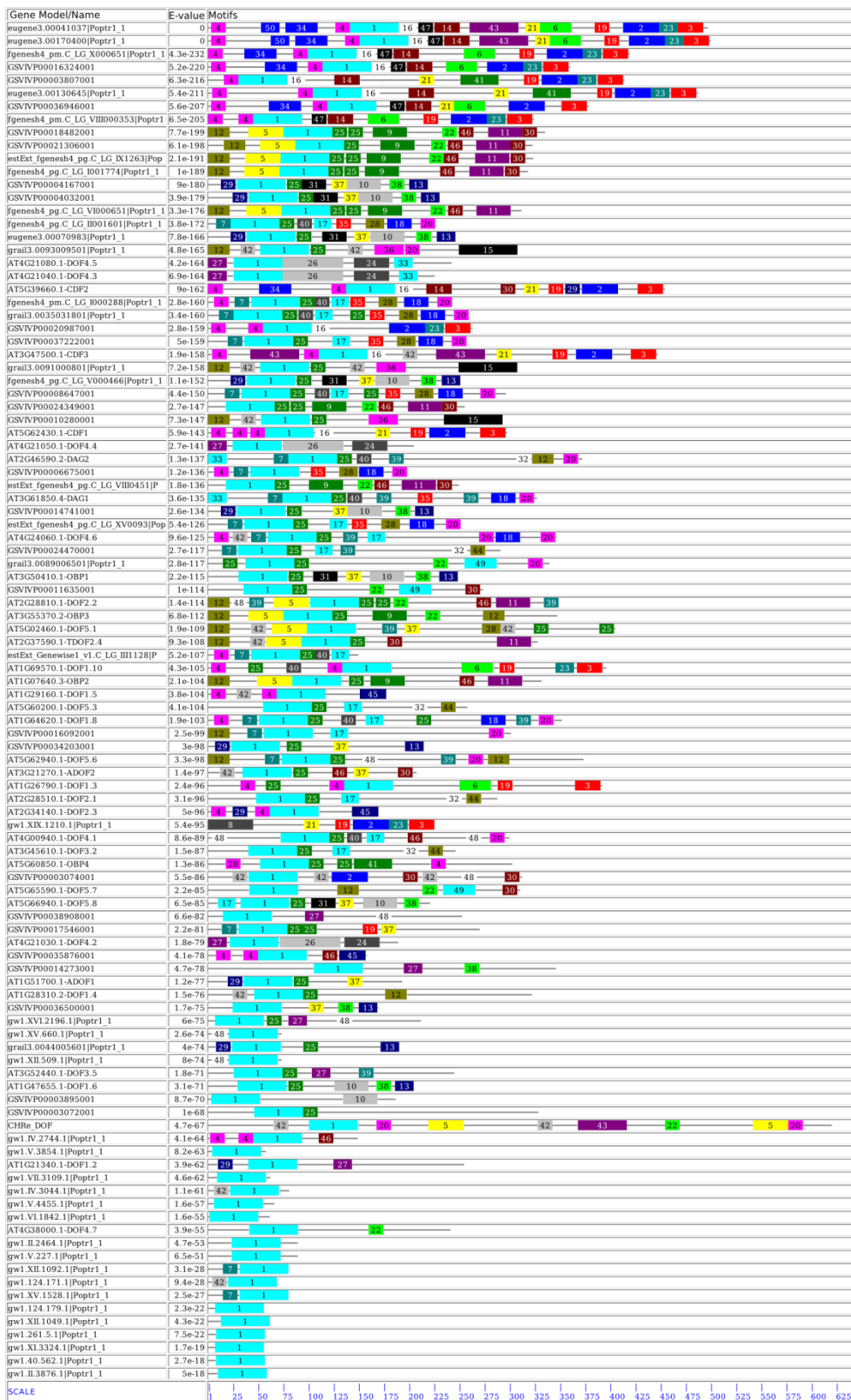
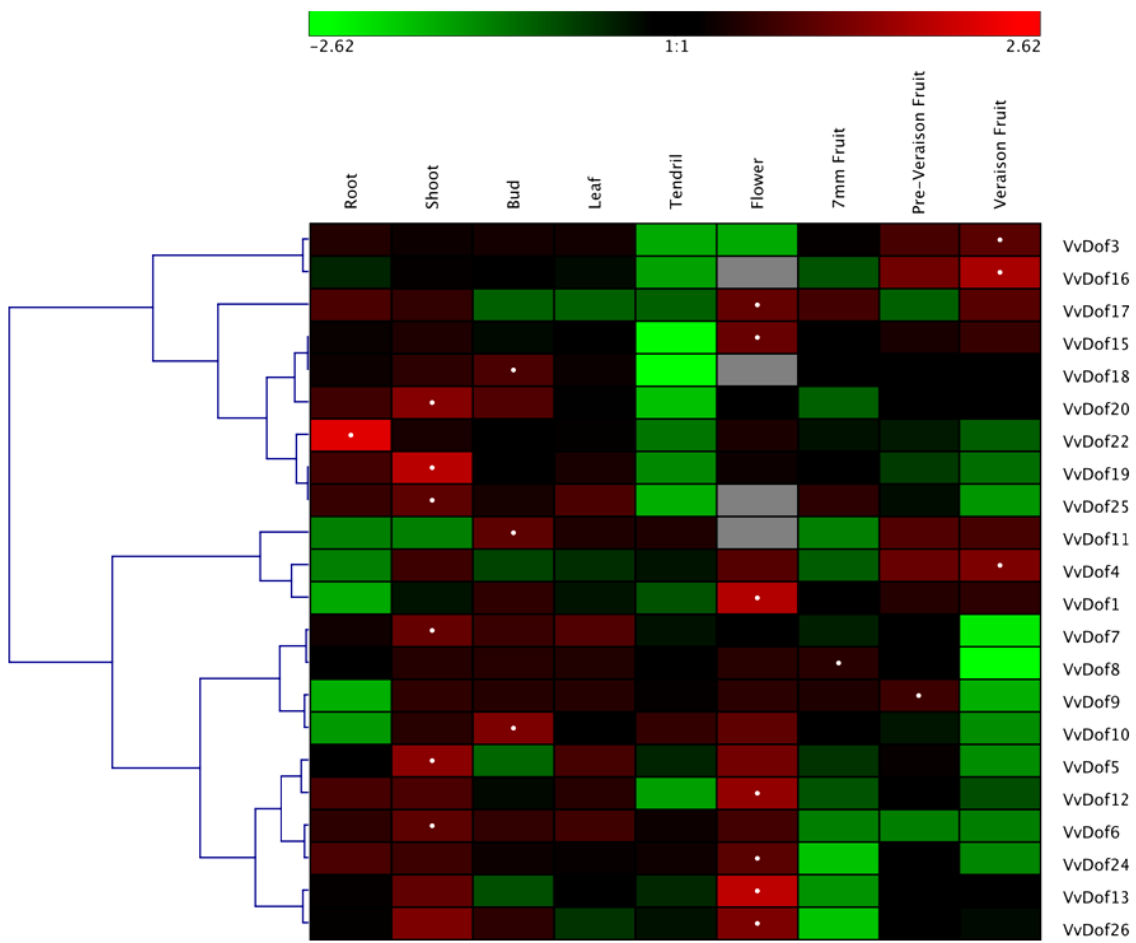


Figure 5



SUPPLEMENTAL DATA FILES

Supplemental Table I. Primers designed and employed in ePCR and RT-qPCR analysis of the grapevine *Dof* genes.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>VvDof1</i>	TAGCTTTCCACCTCCTCCT	GCAGAGGAAACCCAGATGAG
<i>VvDof2</i>	GCCGCTCAAGATTCAGAAC	CAAGCCCATCCAGAGAAAAA
<i>VvDof3</i>	TCTTCATCCTCATTCAAAAC	TTCTCGATTTTGGGCACTTC
<i>VvDof4</i>	CATCCACCCGAGTCTCTCTC	TCTCCGGAAGGTGAAGAAGA
<i>VvDof5</i>	CAAACCTGGTGGGCAGTTAGG	TGGTCCTCAGAGCATCAAGA
<i>VvDof6</i>	CACCGAAACCATCTCTCTCA	AGCTTCGTCTAGTCGTTGCTG
<i>VvDof7</i>	GVGGTGGCACTGCTCTAGTG	AAAAGGCAGTGAGATTCAAAGG
<i>VvDof8</i>	TTCTCTCATACTTCTCTC	ACCCACTTGTTGGGGTCTC
<i>VvDof9</i>	TCTGGGAGTTTACCAGGTT	AACATGAATATCCGGCCAAG
<i>VvDof10</i>	AGATGATGAGAATGAAGAAG	CTAATGGCCTTGTGAAAATAT
<i>VvDof11</i>	TGCCGAAAAACAAGAAGAT	TGAATTGCACCTCCAAATCC
<i>VvDof12</i>	CCTTTGAGAAAAGAAATGTTGG	GGAGGAATCACAACGAGGAC
<i>VvDof13</i>	AACCATGGTTTTCTCATCTGTT	ATCAGCCATCGAACCAAGGTC
<i>VvDof14</i>	TTCTCATCCGTTCCGGTTTA	AGGCCTGATTGTGCCAGTA
<i>VvDof15</i>	CTTCCATGCCATCCTATCTT	TAGAACCTGGCCTGATGGAG
<i>VvDof16</i>	GATCGACTTGCTGTGGTTT	CACTCCATCGCCATGTCTTC
<i>VvDof17</i>	CTCCGCCACTACCTCTTCTG	AGCTGGAAAGATGGATGGAA
<i>VvDof18</i>	TTAGCGGGGGCAGACTCTTT	TTGAGCACCATGCTCTTCCT
<i>VvDof19</i>	TCAGCTCAGGTGATGTTGGA	GGGTCTCATTGCTCTCTGC
<i>VvDof20</i>	TCCAACGTCGTCTTCTCCTA	TGGGATCGTCAATCCTCAGT
<i>VvDof21</i>	GTGCTGAGATGCCAACTGTC	GAGGAACAGGGTAACAGGGC
<i>VvDof22</i>	GAAAAGTAAGCCGCCCTGT	CTGCTCCTACGCCTCTTAGC
<i>VvDof23</i>	CTCGTCGGACGGTAACATTT	AAGAAATCCCGCGGTGATC
<i>VvDof24</i>	GCCGTGGGGCCAGCTCTGAG	CTGGTTGATTGAAGGGCTGT
<i>VvDof25</i>	GGGGTTGCCGGAAGAACAAG	CTGGGTGGCTCTCAGTAAGG
<i>VvDof26</i>	CCCGATCCAAAGGCTAGAAT	ACTACCACCTGCAACAAGG

Supplemental Table II. *Dof* genes annotated from the genomes of *A. thaliana*, *C. reinhardtii* and *P. trichocarpa*.

<i>A. thaliana</i>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>P. trichocarpa</i>	Gene model of <i>P. trichocarpa Dof</i>
AT3G50410.1-OBP1	CrDOF1 (BE725459)	PtDOF1	estExt_fgenes4_pg.C_LG_VIII0451 Poptr1_1
AT1G07640.3-OBP2		PtDOF2	gw1.IV.3044.1 Poptr1_1
AT3G55370.2-OBP3		PtDOF3	fgenes4_pm.C_LG_X000651 Poptr1_1
AT5G60850.1-OBP4		PtDOF4	estExt_fgenes4_pg.C_LG_IX1263 Poptr1_1
AT5G62430.1-CDF1		PtDOF5	gw1.IV.2744.1 Poptr1_1
AT5G39660.1-CDF2		PtDOF6	grail3.0035031801 Poptr1_1
AT3G47500.1-CDF3		PtDOF7	gw1.XV.660.1 Poptr1_1
AT2G34140.1-CDF4		PtDOF8	fgenes4_pg.C_LG_I001774 Poptr1_1
AT1G69570.1-CDF5		PtDOF9	gw1.V.227.1 Poptr1_1
AT3G61850.4-DAG1		PtDOF10	estExt_fgenes4_pg.C_LG_XV0093 Poptr1_1
AT2G46590.2-DAG2		PtDOF11	gw1.VI.1842.1 Poptr1_1
AT1G21340.1-DOF1.2		PtDOF12	fgenes4_pm.C_LG_I000288 Poptr1_1
AT1G26790.1-DOF1.3		PtDOF13	gw1.XVI.2196.1 Poptr1_1
AT1G28310.2-DOF1.4		PtDOF14	gw1.II.2464.1 Poptr1_1
AT1G51700.1-ADOF1		PtDOF15	gw1.XI.3324.1 Poptr1_1
AT3G21270.1-ADOF2		PtDOF16	gw1.40.562.1 Poptr1_1
AT2G28510.1-DOF2.1		PtDOF17	eugene3.00130645 Poptr1_1
AT2G28810.1-DOF2.2		PtDOF18	gw1.XIX.1210.1 Poptr1_1
AT2G37590.1-DOF2.4		PtDOF19	grail3.0044005601 Poptr1_1
AT3G45610.1-DOF3.2		PtDOF20	fgenes4_pg.C_LG_II001601 Poptr1_1
AT3G52440.1-DOF3.5		PtDOF21	gw1.124.171.1 Poptr1_1
AT4G00940.1-DOF4.1		PtDOF22	eugene3.00070983 Poptr1_1
AT4G21030.1-DOF4.2		PtDOF23	gw1.XII.1049.1 Poptr1_1
AT4G21040.1-DOF4.3		PtDOF24	grail3.0093009501 Poptr1_1
AT4G21050.1-DOF4.4		PtDOF25	gw1.V.3854.1 Poptr1_1
AT4G21080.1-DOF4.5		PtDOF26	fgenes4_pm.C_LG_VIII000353 Poptr1_1
AT5G62940.1-DOF5.6		PtDOF27	gw1.XII.1092.1 Poptr1_1
AT5G65590.1-DOF5.7		PtDOF28	gw1.XII.509.1 Poptr1_1
AT5G66940.1-DOF5.8		PtDOF29	fgenes4_pg.C_LG_VI000651 Poptr1_1
		PtDOF30	gw1.V.4455.1 Poptr1_1
		PtDOF31	estExt_Genewise1_v1.C_LG_III1128 Poptr1_1
		PtDOF32	gw1.124.179.1 Poptr1_1
		PtDOF33	gw1.261.5.1 Poptr1_1
		PtDOF34	gw1.XV.1528.1 Poptr1_1
		PtDOF35	gw1.II.3876.1 Poptr1_1
		PtDOF36	grail3.0089006501 Poptr1_1
		PtDOF37	gw1.VII.3109.1 Poptr1_1
		PtDOF38	eugene3.00170400 Poptr1_1
		PtDOF39	fgenes4_pg.C_LG_V000466 Poptr1_1

		PtDOF40	eugene3.00041037 Poptr1_1
		PtDOF41	grail3.0091000801 Poptr1_1
36 ^a	1 ^a	41 ^a	

^anumber of *Dof* genes in the corresponding species

Supplemental Table III. Summary of the motif distribution of Dof proteins from *A. thaliana* (At), *P. trichocarpa* (Pt) and *V. vinifera* (Vv). Motif sequences from 1 to 50 are presented in Table II.

Motif	Vv	At	Pt	Vv & At	Vv & Pt	At & Pt	Vv & At & Pt
1							Y
2							Y
3							Y
4							Y
5							Y
6							Y
7							Y
8			Y				
9							Y
10							Y
11							Y
12							Y
13							Y
14							Y
15					Y		
16							Y
17							Y
18							Y
19							Y
20							Y
21							Y
22							Y
23							Y
24		Y					
25							Y
26		Y					
27							Y
28							Y
29							Y
30							Y
31							Y
32				Y			
33		Y					
34							Y
35							Y
36					Y		
37							Y
38							Y
39				Y			
40							Y
41							Y
42							Y

43						Y	
44				Y			
45				Y			
46							Y
47					Y		
48							Y
49							Y
50			Y				
Total	-	3	2	4	3	1	37

Supplemental Text I. Grapevine Dof protein full sequences in FASTA mode, deduced from gene sequences indicated in Table I.

>GSVIVP00037222001
MDTAQWPQGIGVVKPMESSGPVAERRARPQKDQALNCPRCNSNTNTKFCYYNNYSLSQPRYFCK
TCRRYWTEGGSLRNVPVGGGSRKNKRSTSSSSSSSPASSKLLPDHLITSTPPGFSSASQNPKEH
EGQDLNLAFFFFPEDYNNISSEFADLSYNAMELLKSTGIASRGLGSFMPMSVSDSNSIYSSGFPLQ
EFKPTLNFLSLDGFQSGYGIQESGARLLFPLEDLKQVSNTTEFEQSRGVQGDSAGYWNGMLGGGS
W*

>GSVIVP00006675001
MDTAQWPQEIIVKPLEEIVTNTCPKPALEKRARPQKEQALNCPRCNSNTNTKFCYYNNYSLSQPR
YFCKACRRYWTEGGSLRNIPVGGGQDLNLSFPAAQDFRTLELLTGITSRGLNSFMPMPPIPDPNTV
YTTGFPMQEFKPTLNFLSLDGLGSGYGSSSGRLLFPFEDLKQVSSTADHIEQTREQGDSTGYWTGM
LGGGSW*

>GSVIVP00008647001
MEEAISISINSHTCSKPVLERKARPQKDQAVNCPRCSSNTNTKFCYYNNYSLSQPRYFCKTCRRY
WTEGGTLRNVPVGGGSRKNKRSTSSSSSSSLSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS
LAFPLPQYYHGISQFAEVPKIENNCSSS
TLFTSGFPLQEFKVPHLFSFAHLHGVDPPQNMSTTGRVLPFGEVKQLPATTSTGVDHDCSGNNK
GQGSPTAAAYWNNGMFGGGGGGRGGGGGGGGGSW*

>GSVIVP00016092001
MGLTFLPVCMDSSSEWLQGTAEHEENGMDSSSPSGDMLTCSRPLIERRLRPQHDQALKCPRCDSTH
TKFCYYNNYSLSQPRYFCKTCRRYWTKGGTLRNIPVGGGCRKNKKVASKKSNDSINQNPSPSS
HNPTDLHLSFPEVQFSHLSNLLGSHGGLGNHSFMESKYNGMLENARPIDFMEGKFEAIVGSSRNH
DFMGNCELGMGGLGDMSHGGLAPNFHGLCSPFGVTLDGNGGNFMDTCQRLMLPYEGNVEQN
AMDVKPNTKLLSLDWQDQGCSDAGKDSFVYLNLSLGSWNGMMSNGYGPSTTNPLV*

>GSVIVP00024470001
MDTQSLESMLVCSKAQQERKPRPPEQALKCPRCDSTNTKFCYYNNYSLSQPRYFCKSCRRYWT
KGGTLRNVPVGGGCRKNKRSTSSSSSSSKRTQDQPLTTPNPNLNVLPPLTYDSNDLTLAFARLQKQT
GGQLGYDDHHDDLALMGPNPNTHCVDLGNQCVNTCGTTTPGLLDALRTNFELETSPGYHNLYY
GFGNGGMGGEVENGGVGGHEMVLPEEMSGATTTAVTVTMMKQELCHGREGENRVLWGFPPW
QQLNPDGSMGEVDSGRESWNGLASSWHGLLNSPLM*

>GSVIVP00004167001
MPSDSGDKRPSKPHQTGAPPPEQEHLPCPRCDSTNTKFCYYNNYNSQPRHFCKSCRRYWTHGG
TLRDIPVGGGSRKNAKRSTTTSSASSQEPLPATPVLSLSTNHATSMFVGDVKPTVNVCGSFTS
LLNTQGPFLALGGFGLGLGPGFEDMGFGLGRGVWPFPGAGDGGASGGTGGGTALVGNTWQF
ESGEGGFVAGDCFSWPDLAISTPGNGLK*

>GSVIVP00004032001
RLDETTLLERKMPSDSGDKRPSKPHQTGAPPPEQEHLPCPRCDSTNTKFCYYNNYNSQPRHFCK
KSCRRYWTHGGTLRDIPVGGGSRKNAKRSTTTSSASSQEPLPATPVLSLSTNHATSMFVGDV
KPTVNVCGSFTSLLNTQGPFLALGGFGLGLGPGFEDMGFGLGRGVWPFPGAGDGGASGGTGG
GTALVGNTWQFESGEGGFVAGDCFSWPDLAISTPGNGLK*

>GSVIVP00014741001
MPSEGERRVARPQQVGGHPPQSEHLPCPRCDSTNTKFCYYNNYNSQPRHFCKSCRRYWTQG
GTLRNIPVGGGTRKNSKRSTATSSSSSTLETTTPANPISVSPVLKAETETPQRNGLSLNGDVSSGGT
SLLNSQGPFLALNGFSLGLGPGFEDMGFPAKGVWSYPDVGDVVLGGDGTGSGGGSASSICN
TWQLSGGEVGFVDGDCFAWPDLAISTPGQGLK*

>GSVIVP00036500001

MQSEPGNHQRPTGPPPPENHHHLQCPRCNSTNTKFCYNNYNLSQPRHFCKSCRRYWTHGGA
LRDIPARDNAPKRSRSPVTPPLASYPQVRVPPDLNVGASGSFTRLLNSHGSEFSGLGAEYGLG
SGLHEVGDGGAWQIGIGEEVELVEGNGFTWPDIVSAPGRILKE*

>GSVIVP00034203001

MQDPSTFQPMKTHFPEQEHLKCPRESTNTKFCYNNYNLSQPRHFCKNCRRYWTGGALRNIP
VGGGSRKNTKRSSNPKRPSSSSSTSSVSSPPVSSTSNAAAQKSEPSGIYVTAADQDRRMLDISGSFS
SLLASNGQFGSLLSLNPTGVRGVPLSAFSETPNSDSGRTPAMELQSNNGNSEFLGIQTGDSNCW
NGGNGWPDLAITYTPGSTFQ*

>GSVIVP00011635001

MMSDDIPANPVSKDETQSGGRKTGAHRPPDQVLKCPRCDSPTNTKFCYNNYSLTQPRHFCKT
CRRYWTGGALRNVPVIGGGCRKNKKIKSSSRLSAVSTPCFSIDQPGSSSLMGFNYPVLSVLKQG
ESGFGGAIQDMGSMNVHSSLASSIESLSSIKQDLHWKLQQQLAMLFGGENQKDSVSSVPPEN
QNQKLQPILFQNLISKPEVCAVGNSRKDSASGNPATEWFFDTYTPVPTTTNTSTGGNGNDNTN
HWNGIQAWSDLHQYSTLP*

>GSVIVP00003072001

MLGNCEKMOVVISSTNDWPENQIDDKGLMASTGRVMEKPGQEQQALKCPRCDSSTNTKFCYNN
NYSLSQPRHFCKACKRYWTRGGTLRNVPVGGGCRKNKRVPASSVDAPSSAPTAALNPPPPSQ
IDLSASSNHVTPFLYGLPSNPSELNLPFRFNSRASNETVSGYDLQPQLGALGLGFSSGIIANDTR
TDDYRNGFNPAKQIQDLVTSSSLLSNYSIFGSSSSTTTPTMASLINSLLQQQKFMNGDLKESRGAN
HFQPLVPYEDLQISGNTSMAMKEVKSEHGHTLEWNSVPCQNQIEQIGSSDPSLYWNLTSLGAW
SDLPNMGSSVTSLI*

>GSVIVP00024349001

MADRARVAKIPQPETALKCPRESTNTKFCYFNNYSLTQPRHFCKTCRRYWTRGGALRNVPV
GGCRRNKKSSSSKSPASTERHAGSNSTSAIPSSGTAIEIIGHLPKQASQLPFMPTLQNLTYGIGN
MSLNFGGNLPVMASSVGLSAEGVEQWRLQQVQQFPFLGSEFPPTGLYPFQNEVDKASSSVDRN
GHLPHMVSGSGVAQLTAVKLLNQGLNLSRQFLDTSENNQYVWGNAWTDFSGLNSSTSNRL*

>GSVIVP00018482001

MVFSSVPVYLDPPNWQQQANHQPGGSNDNPHLPQQAPPPLPPVGGGGSGGTGTIRPGSMADR
ARLAKLPQPETALKCPRESTNTKFCYFNNYSLTQPRHFCKACRRYWTRGGALRNVPVGGGCR
RNKRKGNRSKSPVTGERQGGSSASAVPSNSCTSDMIGHLPPLPPPPPPQLSFLPPLHHLADYAGAD
IGLNFGGIQQPVAVSGGGNSGTDIEFPIGSCSGGGPILSGGLAEHWRLQQVQQFPFLAGLEPPSGL
YSFEGEGTEPPSYLGGSGHLRAKALDSGVTQMTAVKIEENQGLNLSRNFLGLPGNDQYWSGNT
WNDLSGFNSSTTSHLL*

>GSVIVP00021306001

MFGFSHIKIGSKGSIIMVFSSMPSYLDPANWQQPHNHEAGSSGLPNQPPPPPPPPPHGGGGTGS
IRPGSMADRANIPLEAALKCPRESTNTKFCYFNNYSLTQPRHFCKTCRRYWTRGGALRN
VPVGGGCRNRKSKGSSKSPVSGDRQAGSSSTGAIHNSCSTAEILGLAPQIPPMRFMAPLHHLA
DYGAGDIGLNYSGIPTAVGGTGDMNFQIGSLEQWRLQQTQQFPFLGGLDPPPGLYPLEGGVEPSN
YVGGSSQVRPKLTGSGLSQVASVKMEDNHEMNVARQFLGIPGNDQYWGNAWTDLASFSSST
SHPL*

>GSVIVP00014273001

GHGEPGYETVEWHPPPFLFPTAPQPTTLAGTFAYCRSHTLLPQSSISSPPPQSPLSFTRITTTSSLYR
PLLLHFIMFSTSDHHMLHCPPRPLPSLDKGWKSNAELAPSCPRCSPNTKFCYNNYSLTQPRYFC
KGCRRYWTGGSLRNVPVGGGCRKNRRGKAVRVPQLERGSNGYGSAPPSSGDSVVVVPPGRT
GGAEIDLAVVFAKFLNHNSGFEPEVAGSALSQTDAAAGNVLGLALNSDAQQEDMAMECGTSLDL
MGEVQLLEGHTQLFDGGEKQIQEERIQEFTSHDDASAYGLPTLLSDEAAQEVLWSDAQTQLQNT
WQPVMQLQEFESVPSYDHSKMSPNLIGEFWSSF*

>GSVIVP00038908001

MEGGVWKANVEISPNCPRCGSSNTKFCYNNYSLTQPRYFCKGCRRYWTGGSLRNVPVGGGC
RKNRRGKSDPDPSGSALADSATTSSGLHDASASNIDLALVYANFLNQMPPEPKSTGFEMPELPC
EFHPSFQLSSTLSTSNSTSLDSSHIQLPPDTHLSEDNQVYLSGFHPIHTHHDHDSANIYGLPPLPGQE
VASPEMLWPISQAMVQNQTLHETQLPALHPEAAQHPNHVAVTAGNWSPFDLSCYETFSRP*

>GSVIVP00020987001
MAEAKDPAIKLFGKTIPLPEVATAAAGNDSPSEEQSETSSIQEKTLLKPKDKILPCPRCNSMDTKFC
YNNYNNVNQPRHFCKNCQRYWTAGGTMRNVVPVAGARRKNKNSTSHYRHITVSEALQIPYGDQ
VMRNCHAYHAFLGLLGLTLGIQLIPPAFSAWGCSTHSRDENMLKASNFGEELQKENNSERCL
WIPKTLRIDDPGEAARSSIWATLGIKNDKADPISGGRLFKSFQSKADEKNHIAETSPVLQANPAAL
SRSLNFHESS*

>GSVIVP00016324001
MQEPKDPFAKLFGKTIPMLADGDAPVSSGDVGDGA AVAREDDGLEEETEKDALGGKPAETKGE
DGSEESRNSETVAESNENPKTPSIAEENAEKGQSDSPDSQEKTLKPKDKILPCPRCNSMDTKFCY
NNYNNQPRHFCKNCQRYWTAGGTMRNVVPVAGARRKNKNSSASHYRHITISEALQTVRIEATNGV
HQPTLKSNGTVLTFGSDAPFCDSMTSAKRNSHGVPSPRIPCIPGIPWPYPWNSAVPPFCPPGFMP
FYPAAYWNWDILKPSIVEDEETPKQRSSERCLWVPKTLRIDDPAEAAKSSIWTTLGIKNDKVDSV
SGGGLFNAFHLKGDDKNHAIDTSAVLRANPAALSRLNFQESS*

>GSVIVP00036946001
MLDFKDPAIKLFGKTISLPLNPHLSPTSPPPPLSSTTSFPDDTSQGLQPPSQDQEFEGKEEDGTSRQ
TSEELKDPTASPGVSENPETPSADKETS KDGEQSEISGSQEKTLKPKDKILPCPRCNSMDTKFCY
NNYNNQPRHFCKNCQRYWTAGGTMRNVVPVAGARRKNKNSSASQYPLQTARASAANGIHHPA
LGNGTVLNFSGDAEKGNIAGLEPVVKNFQAFSPHVPCFPGASWSYPWNPAQWSSKIPPAFCPP
GFPISFYPAAYWGC TVPGSWNIPCIPTSSSPIHSALATNHNSPTLGKHARDGETLRIDDPAEAAK
SSIWTTLGIKNDGSSNGSLLKAFQSKGDEKKRIAEMSPVLQANPAALSRLNFHERA*

>GSVIVP00003807001
MSGLQVHKDQGETNSSAQEKVLKPKDKILPCPRCNSLETKFCYFNNYNNVNQPRHFCKNCQRYW
TAGGTMRNVVPVAGARRKNKHLASQYRQIMVSSDGVPTTVIEASDSSNQILSCGETSTTFRPSTA
SGTVLKFGEAPLCKSMETVLSIREQKRC AEMRTVNCGGNGEPPSSCASSVSAPSPENEFENV
GHKDRPSLPASRSEIHPQLHQPCYVPPWAFPWNPGWNTVAPVAPPQCSSDTVYAPNNSNPNSV
QWCSRPMALAVPGFCAPTIPLQLVPPSYWGCMPWIWAGTGNISLAGSNDCLSPSSSTSNSCSGNAS
PTLGKHSRDAQPAEEQKLEKCVLVPKTLRIIDPDEASKSSIWATLGIKPDQKAPISKGGIFKAFEPK
SGAKTDLSDATQVLEANPAALSRSQTFKEST*

>GSVIVP00035876001
MANQVHAAQDAPGIKLFGATIALHGGEVKEEANNKGDHKEEKRPKEIIPCPRCKSMETKFCYFN
NYNNVNQPRHFCKGCQRYWTAGGALRNVPVAGARRKSKPPCRGVAGFLESCLFDASAGVHQFD
LEGVVVEEWHMGGFRHAFFAKRRRSSSSGGQTC*

>GSVIVP00017546001
MQDIHSMGAGGGRIFGGDRRLRPHQNQALKCPRCESLNTKFCYNNYNNLSQPRHFCKSCRRYW
TKGGVLRNVVPVGGGCRKTKRSKAKSSSDAPRERKSNSHSSSESSLTATTTAAATTATTEAVSAP
SSNAASTLVGFRESRFFAPQSPNPNFEMPTLLDHSSDGNIFPEIGSFTSLMTGSNDPAALGFNIDIS
PFKYQEIEITAGFLDQTVQVELSALQNRSNHGGFPSLDWQTSGDQGFIDLPGNVDDQGYWTQSQ
WSDNDHPLYLP*

>GSVIVP00003074001
MQQDRDKGGLEDVDPDRRLKPAQSENQQQLPQKCPRCDSINTKFCYNNYNSLSQPRYFCK
TCRRYWTQGGTLRNVPVGGGCRKTKRKPSASGDNSRSQLPTQQQQQNLAAAPPNIISTNSGVAV
GPALRIAEPANLSPAPAPASAPTLSSVNPYPAGAFSLPAMRPLNQPQPFPNVVGRDFG
GSNLAILQGFNVPSLGSQQQRQA EFYQMGNDRNIESLYGSGEDLIQSSRPTGHQNNWHQTFI
NPTAPDSNLWSIGSSNNNSNAASSSFNQNHWA DLQGYGPPP*

>GSVIVP00003895001
NLRCPRCDSNTKFCYNNYNNLTQPRHFCKTCRRYWTGGALRNVPVGGGCRKNKNTSVSTAV
GKSSAGKAKSVVSEIGKSLGGGDFDHEIPSNPILWASPQNSHLLALLRATQNPNPNSPISNSVTV
KDDGVMIGSHMASESGVGTGAVNIARNMGLXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXKMALYLVKFKTLGFRSCIKGLDHPLIITPIIHQ*

>GSVIVP00010280001

MVLSSKQVSGDGIDWGHTLLQGGSELELHKPPMMRRQQQQQQQLEPLKCPRCDSTNTKFCYF
NNYNKSQPRHFCKSCKRHWTKGGTLRNVPVGGGRKNKRPKTSATATAAAATPTVTSSPATPTT
SSITNRSNINMGIQTQQQRKSSLALGDHEKSSLDILYQAFIRPPLSVMQNSIGSSNGMSMASIPS
LPPNQLHFPRSLSSFDTSPSSIPSSFQPSNVYNYTGEAEAKDGSTTACFMPSTSGTITQPWQMPA
ASSVDDTTNYWSWDDIDTFVSTDLNIPWDDSEMKP*

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foi possível combinar uma estratégia de amostragem e a metodologia de RDA, denominada “Análise Representacional de Transcritos em Grupos” (do inglês, *Bulk Representational Analysis of Transcripts* ou BRAT). O principal objetivo foi a identificação de genes estágio-específicos da cv. Sultanina, cujos mRNAs acumulam-se em maior proporção, durante o início do desenvolvimento de frutos.

Frutos da cv. Sultanina foram coletados a partir da antese/estabelecimento do fruto (DS0) e em intervalos regulares de duas semanas até a oitava semana de desenvolvimento (DS2, DS4, DS6 e DS8 respectivamente) durante as safras de 2004/2005, 2005/2006 e 2007/2008. Não foi possível realizar amostragens de frutos na safra 2006/2007 em virtude das geadas e chuvas de granizo no período de floração e frutificação das plantas.

Durante a safra de 2004/2005 nos meses de novembro e dezembro, período no qual ocorre o desenvolvimento do fruto da videira, foi caracterizado por temperaturas baixas quando comparadas com a temperatura normal climatológica da região. A precipitação e a insolação apresentaram valores muito próximos ao normal. Essas condições propiciaram boas condições para a floração e frutificação da videira (Mandelli, 2005). Na safra 2005/2006 as temperaturas em novembro foram um pouco superiores, quando comparadas com a normal climatológica da região. A precipitação pluviométrica em outubro foi bem superior à normal enquanto que no mês de novembro ela foi bem abaixo do normal. A insolação foi inferior em outubro e superior em novembro quando comparado à normal climatológica. Nesse período já se podia constatar, em diversas cultivares, que a produtividade desta safra seria menor que a normal, principalmente em decorrência das condições climáticas do inverno (problemas com a brotação) e de primavera (problemas com a floração/pegamento do fruto), além dos originados pela forte estiagem ocorrida no verão de 2005. Soma-se a isso a ocorrência de granizo que, embora localizado, também contribuiu para a quebra de safra em diversas localidades da região produtora de uvas da Serra Gaúcha (Mandelli, 2006).

O verão de 2007/2008 apresentou temperatura média em novembro 1,0°C abaixo e precipitação pluvial 22 mm acima da normal climatológica da região. A sequência de dias chuvosos que ocorreu no final de outubro e início de novembro prejudicou a floração e o pegamento dos frutos de algumas cultivares em que ocorreu coincidência do período chuvoso com o pico da floração. As cultivares que floresceram fora desse período apresentaram boa floração e pegamento dos frutos (Mandelli, 2008).

Utilizando a estratégia BRAT, foram selecionados 16 genes potencialmente envolvidos na regulação do desenvolvimento inicial da cv. Sultanina. Onze genes candidatos foram eleitos por pertencerem aos clusters com maior abundância de transcritos e tiveram seus padrões de expressão temporal confirmados por RT-qPCR na mesma safra utilizada para a construção da biblioteca (2004/2005).

Entre os genes candidatos mais promissores selecionados está o TDF semelhante a fatores de transcrição da família Dof (Yanagisawa et al., 2002), ainda não caracterizado para videira. Esta classe de fatores de transcrição atua em diversas espécies de plantas, e estão envolvidos em funções fisiológicas distintas. Dessa forma, foi conduzida uma análise filogenética comparando o grupo de genes *Dof* em videira com os seus homólogos em outras duas eudicotiledôneas completamente sequenciadas, *A. thaliana* e *Populus*, permitindo identificar claramente clusters de genes parálogos e ortólogos. O padrão de expressão de todos os 26 genes avaliados por RT-qPCR em nove órgãos de videira demonstrou o possível papel dos fatores de transcrição Dof no desenvolvimento do fruto em videira.

1. GENES DE VIDEIRA SEM SEMENTES COM EXPRESSÃO ESPECÍFICA AO ESTÁDIO DE ESTABELECIMENTO DO FRUTO (DS0)

Em cultivares de videira estenoespermocárpicas como Sultanina, é esperado que o desenvolvimento da semente cesse entre três e seis semanas após o DS0 (Stout, 1936). Neste trabalho, a cultivar Sultanina foi utilizada como modelo de estudo para desenvolvimento de frutos sem sementes, dessa forma, esperava-se encontrar transcritos de genes cruciais responsáveis pelo desenvolvimento do fruto em uma espécie apirênica. Entre DS0 e DS4 foram selecionados três genes candidatos para determinação do perfil transcricional por RT-qPCR.

O primeiro deles, um potencial gene codificante de uma proteína de ligação a oligouridilatos (*VvUBP1*) foi identificado e confirmou sua expressão nos estádios iniciais DS0 e DS2 da formação da baga (Figura 4A; Capítulo II). *UBP1* é uma ribonucleoproteína nuclear heterogênea previamente identificada em extrato de planta nuclear com um papel na maturação no pré-mRNA. Ela está frequentemente associada com íntrons ricos em Uracilas (U), sugerindo que *UBP* é importante para recrutar a maquinaria do *splicing* de pré-mRNAs. Também foi sugerido que estas proteínas funcionam como um complexo para estabilizar mRNA pela ligação com sequências ricas em U (Lambermon et al., 2000, Wang & Brendel, 2004). *UBP1* de plantas foi adicionalmente descrita sendo importante no *splicing* alternativo (Steiger et al., 2003) e na formação de microRNAs (miRNAs) que podem causar repressão na tradução e clivagem do mRNA (Arteaga-Vázquez et al., 2006). Baseado nestas atividades, pode-se considerar *VvUBP1* um interessante gene candidato possivelmente relacionado com o início do desenvolvimento de frutos na cultivar Sultanina.

O segundo gene candidato selecionado do grupo de TDFs de DS0 foi nomeado *VvFS41*. Ele codifica uma potencial proteína ribossomal tipo S1 que, juntamente com moléculas rRNA, sintetizam subunidades ribossomais envolvidas no processo celular da tradução. Os genes dessa classe também são responsáveis pela estabilização de estruturas de rRNA altamente compactadas pelo preenchimento das alças entre os domínios de RNA (Gueydan et al., 2002). Embora *VvFS41* codifique uma proteína ribossomal com funções aparentemente gerais e essenciais para todas as células de plantas, e não exclusivamente para a formação de fruto e semente, a sua expressão aumentada durante DS0 e DS2 (Figura 4B; Capítulo II) está de acordo com o fato que é exatamente nestes estádios que ocorre maior síntese e processamento de RNA e proteína, por exemplo, durante a divisão celular em frutos. É importante mencionar que a escolha dos genes candidatos foi baseada no fato de que eles pertencem aos clusters com maior abundância de transcritos dos TDFs obtidos após subtração por BRAT.

O gene candidato (*VvPHPI*) é um uma proteína de choque térmico (Hsp70), potencialmente relacionada na resposta hipersensitiva em plantas (HSR). Análise de RT-qPCR revelou um maior acúmulo de mRNA de *VvPHPI* nos estádios de desenvolvimento do fruto DS6 e DS8 (Figura 4C; Capítulo II). Embora não seja possível explicar a discrepância, é razoável especular que os genes relacionados com a defesa das plantas poderiam aumentar suas expressões no final da formação da semente e do fruto, após o início da divisão celular e quando as temperaturas do verão tendem a

umentar. É também nestes estádios que sementes e frutos acumulam mais produtos nutritivos atraindo insetos e outros herbívoros. Dentro da diversificada família de genes Hsp, Hsp70 é o membro mais estudado. A proteína codificada e altamente conservada de 70 kDa tem um papel chave na resposta a estresse em plantas (Vierling, 1991) e em animais (Ohtsuka & Hata, 2000). Além disso, é relatado um maior acúmulo de mRNA de Hsp no citosol de plantas em resposta a diferentes tipos de estresses, especialmente a altas temperaturas (Mishra et al., 2002, Cronjé et al., 2004). Tem sido proposto que as proteínas Hsp funcionam como chaperonas de proteínas desnaturadas e participam na translocação e/ou degradação de proteínas danificadas (Bukau & Horwich, 1998).

Os genes *VvAHS1* (*auxin:hydrogen symporter* ou seu sinônimo *Ethylene-insensitive root 1*) e *VvCSS1* (*Cabernet Sauvignon seed normalized*) foram escolhidos como genes candidatos para análises posteriores por RT-qPCR. A escolha do gene candidato *VvAHS1* ocorreu devido ao seu envolvimento na expressão gênica pós-transcricional, processamento de mRNA e rRNA, exportação e estabilidade de RNA. A auxina induz a síntese de etileno em muitas espécies de plantas (Taiz & Zeiger, 2006). Além disso, estudos vêm sendo realizados para verificar as possíveis interações entre auxinas e etileno durante o desenvolvimento e enraizamento de plantas. Clark et al. (1999) verificaram que o etileno tem papel fundamental em respostas a estímulos ambientais em vários tipos de raízes. No entanto, serão necessários experimentos com mutantes sensíveis a auxinas para auxiliar no esclarecimento da interação entre etileno e auxina durante a formação de raízes adventícias.

O gene *VvCSS1* pertence a uma superfamília de proteínas *Hin1* (*Harpin1-induced protein*) envolvidas na resposta de hipersensibilidade (HR) em plantas. Além de eliciar várias respostas de defesa ativa em plantas levando à HR (Baker et al., 1993, He et al., 1994), proteínas *Harpins* também participam nos mecanismos de resistência a doenças em plantas, reduzindo o crescimento bacteriano (Dong et al., 1999). Foi demonstrado que esta proteína induz a ativação de duas enzimas tipo MAPK em células de *A. thaliana* (Desikan et al., 1999). Vários homólogos MAPK foram identificados em *A. thaliana* (Mizoguchi et al., 1997), mas ainda há pouca informação disponível sobre o papel específico das MAPKs em respostas de defesa (Yang et al., 2001). Em um estudo realizado por Desikan et al. (2001) foram identificadas duas enzimas tipo MAPK (*AtMPK4* e *AtMPK6*) ativadas por *Harpins*.

Provavelmente não foram obtidos resultados satisfatórios de RT-qPCR para *VvAHS1* e *VvCSS1* devido à falha na projeção dos oligonucleotídeos, resultando na falta

de especificidade dos mesmos. É importante ressaltar que a base genômica utilizada para a projeção dos oligonucleotídeos foi a da cultivar *Pinot Noir*. Possivelmente a variabilidade normal entre cultivares possa ter sido um fator determinante para a inespecificidade de alguns oligonucleotídeos.

2. GENES DE Videira SEM SEMENTES COM EXPRESSÃO ESPECÍFICA DE QUATRO SEMANAS APÓS DS0

A estratégia de subtração DS4 vs. DS0 + DS8 resultou em 75 classes de TDFs específicos de DS4 (Figura 3; Capítulo II). Análises de RT-qPCR confirmaram que todos os quatro genes candidatos eleitos deste grupo têm seus níveis de mRNA máximos em torno do estágio intermediário de formação do fruto (Figura 4, Capítulo II), especialmente em DS4. O primeiro candidato deste grupo é o *VvRIP1*, um potencial gene ASR (Ácido abscísico, estresse, amadurecimento, do inglês “*Abscisic acid, Stress, Ripening*”) que codifica uma proteína induzida pelo amadurecimento (RIP). Genes ASR parecem estar envolvidos em resposta transcricional ao estresse hídrico e expressos durante o amadurecimento do fruto em diversas espécies de plantas (Maskin et al., 2001). Nenhum gene ASR foi encontrado no genoma de *A. thaliana* e somente uma cópia do gene foi detectada em videira através da hibridização por *Southern blot* (Cakir et al., 2003). Interessantemente em tomate, a proteína ASR1 foi localizada no núcleo e parece estar ligada em uma sequência específica de DNA (Kalifa et al., 2004). Além disso, proteínas ASR de outras espécies foram também localizadas no núcleo onde regulam promotores específicos (Cakir et al., 2003, Wang et al., 2005, Yang et al., 2005). Estas descobertas sugerem que proteínas ASR são fatores de transcrição os quais provavelmente são genes alvos transportadores de hexoses e responsivos ao ácido abscísico (ABA). Dessa forma, muitos genes ASR são induzidos por ABA e envolvidos em transporte de açúcar em resposta à ABA. De fato, ABA e açúcares agem de maneira sincronizada durante o processo de desenvolvimento em plantas (Finkelstein & Gibson, 2002). *VvRIP1* foi altamente expresso durante DS4, e dessa forma, não parece estar envolvido no início da síntese de hexose, pois tal composto é acumulado somente durante DS8 quando inicia seu acúmulo em frutos de videira (Figura 4D; Capítulo II). Devido ao forte efeito de ABA na formação de semente, sugere-se o envolvimento de *VvRIP1* no aborto de semente de Sultanina como um gene responsivo a ABA. O ABA

está envolvido como regulador primário da iniciação e manutenção da semente, da dormência de gemas e em resposta a estresse em plantas, principalmente ao estresse hídrico. Além disso, ABA influencia muitos outros aspectos no desenvolvimento de plantas interagindo, geralmente como antagonista à diferentes hormônios auxina, citocinina, giberelina, etileno e brassinosteróides (Bewley & Black, 1994). ABA poderia agir diretamente (e negativamente) em genes responsáveis pela formação de semente ou através da ativação/repressão de genes regulatórios secundários. Tal hipótese tem suporte no fato de que existe uma degeneração do embrião em cultivares de uva Sultanina, a qual ocorre entre a 3^a e 6^a semana após a antese (Stout, 1936), exatamente o período de maior expressão de *VvRIP1*.

O segundo gene candidato (*VvP450*) deste grupo é um potencial codificador do citocromo P450 (CYP450), o qual pertence a uma grande e diversificada família de hemoproteínas. Estas utilizam uma grande quantidade de compostos endógenos e exógenos como substratos de reações enzimáticas. CYP450 normalmente são partes das cadeias multicomponentes a transferência de elétrons, chamado P450, contendo sistemas que são conhecidos por conduzir à síntese de vários ácidos graxos conjugados, hormônios vegetais, compostos defensivos ou medicamentos importantes. Em *A. thaliana*, Ito & Meyerowitz (2000) descreveram um mutante chamado 28-5 ap2-1 no qual a superexpressão de uma enzima tipo CYP450 (CYP78A9) induziu frutos grandes e sem sementes. Embora a função das proteínas codificadas pela subfamília CYP78A seja ainda desconhecida, os membros desta família têm sido descritos como codificadores de fatores de transcrição específicos de flores e meristemas.

Uma provável função dos membros da subfamília CYP78A pode ser a produção de sinais que ativa ou reforça o desenvolvimento dos frutos devido ao seu grande envolvimento na síntese ou degradação de produtos secundários vegetais. Os fortes efeitos da superexpressão CYP78A9 em *A. thaliana* intuitivamente pode ser comparado com os dados observados para o perfil da expressão de *VvP450* na cv. Sultanina. Análise de RT-qPCR revelou que *VvP450* apresenta seu maior nível de mRNA em torno da fase de formação bagas, especialmente em DS4. O fato da degeneração do endosperma em uvas Sultanina ocorrer entre a 3^a e 6^a semana após a antese, exatamente o período da mais alta expressão da *VvP450* (Figura 4E; Capítulo II), sugere que *VvP450* pode exercer uma influência específica, seja na formação sementes ou sobre o aborto de sementes.

Um cDNA potencialmente codificando um fator de transcrição de uma proteína Dof homóloga de *A. thaliana* foi identificada em DS4. Segundo a análise de RT-qPCR, o nível de mRNA de *VvDof1* foi maior em DS4, mantendo tais níveis até DS8 (Figura 4F; Capítulo II). Como *VvRIP1*, esta maior expressão coincidiu com o período de morte do embrião em frutos Sultanina (Bouquet & Danglot, 1996). Além disso, propõe-se que *VvDof1* é também um gene candidato chave envolvido no desenvolvimento da semente em frutos de uva. Apoiando nossos resultados, as proteínas Dof foram descritas como sendo envolvidas na germinação de sementes (Papi et al., 2000, Gualberti et al., 2002), embora muitos outros papéis fisiológicos tenham sido propostos para estas proteínas até o momento. Os papéis incluem respostas a estresses (Zhang et al., 1995, Chen et al., 1996, Kang et al., 2003), resposta a luz (Yanagisawa & Sheen, 1998, Yanagisawa, 2000, Papi et al., 2002), sinalização do fitocromo (Park et al., 2003), resposta hormonal em plantas incluindo auxinas (De Paolis et al., 1996, Kisu et al., 1998) e giberilinas (Washio, 2001, Mena et al., 2002), e expressão tecido-específica no endosperma (Vicente-Carbajosa et al., 1997, Mena et al., 1998), folhas (Yanagisawa & Sheen, 1998) ou células-guarda (Plesch et al., 2001). Mais recentemente, Imaizumi et al. (2005) e Skirycz et al (2006) relataram o envolvimento de fatores de transcrição Dof em fotoperíodo de floração e biossíntese dos metabólitos secundários glucosinolatos, respectivamente.

O último gene candidato selecionado entre os mais expressos em DS4 pelo BRAT foi *VvERF1*, nomeado após identificado como fator de transcrição responsivo ao etileno (ERF) em videira conhecido como TINY. Análise de RT-qPCR, no entanto, mostrou que *VvERF1* é mais expresso em DS2 (Figura 4G; Capítulo II). As proteínas ERF constituem uma ampla família de fatores de transcrição que pertence à superfamília AP2/ERF a qual também contém as famílias AP2 e RAV (Riechmann et al., 2000). Proteínas AP2/ERF têm funções importantes na regulação transcricional de uma variedade de processos biológicos relacionados com o crescimento, desenvolvimento e em respostas a estímulos ambientais. Enquanto genes da família AP2 participam da regulação de processos como desenvolvimento floral (Elliott et al., 1996), determinância do meristema apical (Chuck et al., 1998), identidade da célula epidermal da folha (Moose & Sisco, 1996) e desenvolvimento do embrião (Boutilier et al., 2002), o envolvimento dos membros da família RAV está mais relacionado com etileno (Alonso et al., 2003). Além disso, após a descoberta do primeiro ERFs em tabaco (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995), muitas proteínas da família ERF foram

identificadas e sugerida sua participação em muitos processos celulares tais como transdução de sinal hormonal (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995), resposta ao estresse biótico (Yamamoto et al., 1999, Gu et al., 2000) e abiótico (Stockinger et al., 1997, Liu et al., 1998, Dubouzet et al., 2003), regulação do metabolismo (van der Fits & Memelink, 2000, Zhang et al., 2005), e em processos de desenvolvimento (Banno et al., 2001, Chuck et al., 2002) em várias espécies de plantas. Além disso, é importante considerar *VvERF1* um bom candidato relacionado com a degeneração da semente em uva Sultanina devido ao seu padrão temporal de expressão e seu potencial papel no desenvolvimento do embrião.

O gene *VvPPP2A* (*putative protein phosphatase 2A*) foi escolhido como gene candidato por estar envolvido em diversos processos celulares tais como, replicação do DNA, transcrição, transdução de sinal e metabolismo intermediário (McCright et al., 1995). Além disso, compreende uma família de fosfatases de serina-treonina, contendo uma subunidade catalítica bem conservada, cuja atividade é altamente regulada. A regulação é realizada principalmente por membros de uma família de subunidades reguladoras, que determinam a especificidade do substrato, a localização celular e atividade catalítica das Holoenzimas PP2A. Além disso, a subunidade catalítica está sujeita a dois tipos de modificações pós-traducionais, fosforilação e metilação, os quais são importantes reguladores do processo. O uso de inibidores específicos de PP2A e as análises de genética molecular de leveduras, *Drosophila* e camundongos revelaram papéis para PP2A na regulação do ciclo celular, na morfologia e no desenvolvimento. PP2A também desempenha um papel importante na regulação de cascatas específicas de transdução de sinal (Janssens & Goris, 2001).

3. GENES DE Videira SEM SEMENTES COM EXPRESSÃO ESPECÍFICA DE OITO SEMANAS APÓS DS0

Os maiores números de genes estádios-específicos resultantes da subtração BRAT foram encontrados em DS8 (Figura 3; Capítulo II). Neste último estágio de formação do fruto que inicia após o *véraison*, os frutos das uvas com sementes atingem seus tamanhos finais. Baseado em conhecimentos prévios, espera-se que o aborto de semente em Sultanina estenoespermocárpica e em outras cultivares de uva sem semente ocorra em DS0 e DS4 (Ledbetter & Ramming, 1989). Assim, neste estágio seria

esperado como mais expressos os genes codificando proteínas possivelmente importantes na reabsorção do tecido da semente e, como consequência de suas atividades, somente traços de sementes poderiam permanecer nos frutos de videira.

Um provável receptor de ácido giberélico similar a *GID1L1* estava presente entre os transcritos mais adundantes em DS8. A análise de RT-qPCR mostrou que esta classe de transcrito foi também igualmente abundante em DS2 (Figura 4H; Capítulo II). Concentrações ativas de giberelinas em uvas são mais altas em flores e frutos após a antese, mas geralmente decai para níveis mais baixos em bagas em desenvolvimento (Symons et al., 2006). No entanto, de acordo com Perez et al (2000), foi verificado um segundo pico de atividade da giberelina no início da fase *lag* que coincide exatamente com o início do DS8 e é 77 vezes maior nas sementes, em comparação com o mesocarpo das bagas.

Adicionalmente, giberelinas promovem a apirenia em uvas com sementes e ajudam na supressão de vestígios de sementes durante o desenvolvimento de uvas sem semente (Ben-Tal, 1990, Aguero et al., 2000, Reynolds et al., 2006). Portanto a presença de *VvGID1L1* em DS8 e DS2 (Figura 4H; Capítulo II) em Sultanina, corrobora com estas observações e reforça a possibilidade de que isto pode implicar no passo inicial do aborto de semente. Hipoteticamente, altas concentrações de um receptor giberélico como *GID1L1* poderia ser típico em uvas estenoespermocárpicas, fazendo-as mais sensíveis a baixas concentrações de hormônio e, além disso, determinando, pelo menos em parte, o fenótipo apirenia.

De acordo com a hipótese de Bouquet & Danglot (1996) a expressão da estenoespermocarpia é controlada por três genes recessivos independentemente herdados e controlados por um gene regulador dominante. O modelo proposto é o primeiro exemplo do controle de uma característica de importância agrônômica em videira, por um gene regulador. Uma das hipóteses mais plausíveis para explicar a regulação da expressão da apirenia em videira envolve o efeito de giberelina sobre a biologia do desenvolvimento das flores e bagas jovens. A aplicação do redutor de crescimento Cycocel, 18 dias antes da floração, reduz significativamente a expressão de apirenia em uva estenoespermocárpica (Ledbetter & Shonnard, 1990). Como o Cycocel normalmente age como um inibidor da biosíntese de giberelinas propõe-se que a expressão do caráter apirenia/pirenia esteja ligada à concentração de giberelinas endógenas nas flores e frutos jovens, durante a antese e na fase pós-florescimento.

VvCLP1 potencialmente codifica uma proteína tipo CONSTANS (*CONSTANS-LIKE*). Os genes CONSTANS codificam membros de uma família de proteínas *zinc-finger* organizados dentro de três grupos na base de variações entre regiões B-box (Robson et al., 2001).

Numerosos genes CONSTANS têm sido correlacionados com os diferentes aspectos do florescimento de plantas, especialmente no que se refere ao fotoperíodo e relógio circadiano (Cheng & Wang, 2005, Ben-Naim et al., 2006, Wenkel et al., 2006, Kim et al., 2007).

No presente trabalho *VvCLP1* foi encontrado entre transcritos mais abundantes de acordo com a nossa metodologia BRAT em DS8. Todavia, diferentemente do *VvGID1L1* que demonstrou a maior abundância deste transcrito nesse estágio por RT-qPCR, *VvCLP1* exibiu os níveis mais baixos de mRNA exatamente em DS8 (Figura 4I; Capítulo II). Pela ausência de dados que possam explicar a discrepância, não é possível validar o resultado obtido pelo método BRAT.

Da mesma forma que *VvCLP1*, os genes candidatos *VvUPP1* (Figura 8A, Anexo II) e *VvFBA1* (Figura 8B, Anexo II) exibiram os mais baixos níveis de mRNA em DS8. *VvUPP1*, também conhecidas como *VvGrip4* são proteínas ricas em Prolina e consideradas como componentes estruturais da parede celular. Várias classes destas proteínas têm sido descritas (Deepak et al., 2007), dentre as mais conhecidos estão a HRGPs (hidroxiprolina, ricas em glicoproteínas), PRPs (prolina, ricos em proteínas) e HyPRPs (híbrido prolina, ricos em proteínas). HRGPs são também chamadas de extensinas em espécies de dicotiledôneas, além de serem as proteínas estruturais mais abundantes nas paredes das células vegetais, elas são induzidas em resposta a resistência à doenças, especificamente em interações incompatíveis com o patógeno (Davies et al., 1997).

PRPs têm sido descritas em espécies de dicotiledôneas. Em soja, foram observados três genes que são expressos em diferentes tipos de células durante o a germinação de plantas. Essas proteínas têm um sinal típico de peptídeos repetitivos. No caso das PRPs de soja, os mais frequentes são os elementos repetitivos pentapeptídeos denominado PPVXK (Hong et al., 1994). Outras proteínas ricas em glicinas (GRP), com sequências repetitivas que são consideradas como componentes estruturais da parede celular, são igualmente descritas em diferentes espécies dicotiledôneas. Em videira, Davies & Robinson (2000) relataram um grande número de genes induzidos durante o *véraison* (Grip). Um desses, denominado de *VvGrip4*, uma hidroxiprolina de

girassol, envolvida na estrutura da parede celular foi detectada em altos níveis no estágio de amadurecimento de videiras e teve uma função específica no processo de amadurecimento das bagas.

Uma proteína típica da família “*Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme*” (*VvFBAI*) foi identificada como candidata potencialmente envolvida com o estágio de desenvolvimento DS8 (Figura 8B, Anexo II). Este gene é uma proteína envolvida no metabolismo de carboidratos, ou seja, na glicólise (Angeles-Castillejo et al., 2004, Azama et al., 2003). Em um trabalho realizado por Kamada et al. (2005) estas proteínas mostraram altos níveis de expressão devido ao estímulo gravitacional. Dessa forma, foi sugerida a participação das mesmas nos sistemas de chaperonas envolvidas em repostas à gravidade da raiz em *A. thaliana*.

Hanania et al (2007) recentemente sugeriram que a proteína chave determinando a apirenia em uva é a chaperonina 21 do cloroplasto (ch-Cpn21), identificada após análise da expressão diferencial de genes entre linhas de uvas com e sem semente da cultivar Sultanina. Estes autores mostraram que o silenciamento de ch-Cpn21 em tabaco e tomate usando o sistema VIGS resultou na redução do crescimento, clorose e aborto de semente, reforçando a idéia de que o papel chave para ch-Cpn21 na formação de semente. Porém, no presente trabalho, foi demonstrado que em cultivares de uva sem sementes Sultanina a expressão do gene ch-Cpn21 (*VvCPN21*) foi maior somente em DS6 (Figura 4J; Capítulo II), quando as sementes poderiam já estar totalmente desenvolvidas em uvas normais. Se *VvCPN21* tivesse um papel chave no início da formação de sementes em uvas, seria esperado uma expressão mais proeminente entre DS0 e DS4.

4. PADRÃO DE EXPRESSÃO ENTRE SAFRAS

A expressão relativa de *VvUBP1*, *VvRIP1*, *VvP450*, *VvDof*, *VvCLP1* e *VvGID1L1* foi avaliada por RT-qPCR nas safras de 2005/2006 e 2007/2008.

O gene *VvUBP1* confirmou sua expressão nos estádios iniciais (DS0 e DS2) da formação da baga durante as safras 2004/2005 (Figura 4A; Capítulo II) e 2005/2006 (Figura 7A; Anexo II), porém em 2007/2008 sua expressão foi maior em DS0 e DS6. Isto demonstra que apesar da técnica de RDA ser facilmente reprodutível, requer cuidados adicionais quando forem executadas alterações ao processo original. Dessa

forma, pode haver aumento na ocorrência de falsos-positivos e conseqüentemente dificultarem a repetibilidade dos resultados em diferentes épocas. Interações ambientais também podem estar relacionadas com a alteração no padrão de expressão do gene candidato demonstrando que a sua expressão é fortemente modificada por fatores não controlados.

A maior expressão de *VvRIP1* foi nos estádios iniciais da formação da baga, diminuindo progressivamente até o estádio DS8 durante as safras 2005/2006 (Figura 7B; Anexo II). Na safra 2007/2008 *VvRIP1* também apresentou maior expressão em DS0, no entanto, seus níveis diminuíram bruscamente após este período. Nota-se que em todas as safras analisadas, os mais elevados níveis de expressão de *VvRIP1* foram nos estádios iniciais de desenvolvimento do fruto, indicando que este de fato não parece estar envolvido no início da síntese de hexose e portanto neste caso, não participar do processo de amadurecimento do fruto. Estudos adicionais devem ser realizados para comprovar seu possível envolvimento no desenvolvimento de frutos sem sementes da cultivar Sultatina.

VvP450 apresentou os níveis mais altos de expressão relativa nos estádios iniciais (DS0 e DS2) nas duas safras (Figura 7C; Anexo II), diferentemente da safra de 2004/2005 onde a expressão foi maior em DS4 (Figura 4E; Capítulo II). De certa forma, a expressão de *VvP450* parece estar concentrada nos estádios iniciais de desenvolvimento do fruto, abrangendo ainda, o período de degeneração do endosperma e morte do embrião em uvas Sultanina.

O padrão de expressão de *VvDof1* foi similar entre as safras 2004/2005 e 2005/2006 (Figura 7D, Anexo II). No entanto na safra 2007/2008 os mais altos níveis foram observados em DS0 e DS6, níveis mais baixos em DS4, justamente o oposto observado na safra 2004/2005 (Figura 4F; Capítulo II). A discrepância observada na safra 2007/2008 pode ter ocorrido por diversos fatores, especialmente por interações ambientais, já que foram detectadas neste período mudanças climáticas consideráveis (Mandelli, 2008).

A expressão relativa de *VvCLP1* foi avaliada também durante as safras de 2005/2006 e 2007/2008 (Figura 7E, Anexo II). Semelhante ao que foi observado na safra 2004/2005, os níveis mais altos de expressão de mRNA foram durante os estádios iniciais de desenvolvimento do fruto da videira Sultanina, confirmando o padrão de expressão de *VvCLP1*, o qual exibiu os níveis mais baixos de mRNA exatamente em DS8.

A expressão de *VvGID1L1* foi diferenciada entre as três safras testadas. Durante a safra de 2004/2005 não houve diferença significativa em nível de expressão entre todos os estádios de desenvolvimento, exceto para o estádio DS4, onde foram observados níveis mais baixos deste transcrito. (Figura 4H; Capítulo II). Em 2005/2006 os mais altos níveis de expressão de mRNA foram observados durante os estádios de desenvolvimento DS0 e DS2, enquanto que em 2007/2008 observou-se uma maior expressão em DS0 e DS6 (Figura 7F, Anexo II).

Os genes testados não mantiveram o mesmo padrão de expressão entre as safras analisadas, indicando possivelmente que a modulação da sua expressão é fortemente afetada por condições ambientais adversas.

5. ANÁLISE MOLECULAR E FILOGENÉTICA DA FAMÍLIA DE PROTEÍNAS DOF EM VIDEIRA

No presente trabalho, foi possível verificar o alinhamento perfeito das sequências dos 52 aminoácidos do domínio tipo Dof dos 26 membros da família de fatores de transcrição Dof (Figura 1; Capítulo III), incluindo os quatro resíduos de cisteína bem conservados característico dessa classe de fatores de transcrição em *A. thaliana*, *Populus*, arroz e outras plantas. Estas características sugerem que os domínios Dof identificados em videira possam ser funcionais.

Foi realizada a localização física dos genes *Dof* nos cromossomos de videira de forma que seis genes *Dof* foram posicionados em um ultracontig, cuja localização entre os cromossomos videira é ainda obscuro (Figura 2; Capítulo III). Muitos outros genes importantes já foram localizados no mesmo ultracontig, como os genes MikC do tipo MADS-box (Diaz-Riquelme et al., 2009) entre outros (Jaillon et al. 2007; Velasco et al., 2007).

As relações filogenéticas entre as proteínas de arroz e *A. thaliana* da família Dof foram previamente estabelecidas por Lijavetzky et al. (2003). Na presente Tese, foi desenvolvido um estudo filogenético semelhante entre *V. vinifera*, *P. tricarpha* e *A. thaliana*, a fim de identificar supostos genes ortólogos e parálogos entre *Dof* de videira, em três espécies eudicotiledôneas com genomas sequenciados e disponíveis publicamente. A análise filogenética permitiu identificar claramente pares ortólogos entre as espécies. Dentre as estratégias testadas, com base na distância, parcimônia e

métodos da Máxima Verossimilhança, somente *Neighbor-Joining* permitiu apoio aceitável para o estabelecimento de árvores filogenéticas. Como muitos autores observaram anteriormente (Yanagisawa, 1995; Zhang et al., 1995; De Paolis et al., 1996; Vicente-Carbajosa et al., 1997; Mena et al. 1998, Lijavestky et al., 2003, Yang et al., 2006; Moreno-Risueño et al., 2007), o domínio Dof é extremamente conservado entre as proteínas e a única estratégia que permitiu gerar árvores consistentes foi baseado em sequências de fora do domínio Dof.

Como seria esperado de uma análise comparativa do genoma entre espécies dicotiledôneas, o número de genes ortólogos *Dof* encontrado entre *P. tricornis*, *V. vinifera* e *A. thaliana* (17) foi maior do que entre *A. thaliana* e monocotiledôneas (apenas sete em arroz; Lijavetzky et al., 2003), mesmo considerando que o arroz abriga quatro genes *Dof* a mais do que videira.

O presente estudo filogenético indica uma distribuição global no interior dos grandes agrupamentos de ortólogos (MCOGs, do inglês: *Major Clusters of Orthologous*) dos potenciais genes *Dof* que podem exercer funções básicas nas três eudicotiledôneas avaliadas.

Conforme relatado para famílias de outras proteínas (Pinyopich et al. 2003), a criação de novas funções de genes por eventos de duplicação contribui para a diversificação evolutiva do genoma além de ser uma fonte de novidade evolutiva (Gilbert et al. 1997). O modelo clássico de Ohno DDC (do inglês, *duplication-degeneration-complementation*; Ohno 1970) sobre o destino dos genes duplicados, prevêem para cada uma das duplicatas o ganho de uma nova função (neofuncionalização), a perda de função (pseudogenização) ou a sobreposição de funções redundantes (subfuncionalização; Force et al. 1999; Lynch & Force de 2000, Duarte et al., 2000).

Moreno-Risueño et al. (2007) sugeriram que a duplicação de um ancestral *Dof*, possa ter ocorrido de um ancestral eucarioto fotossintético, seguido pelo subsequente processo de neofuncionalização, subfuncionalização e pseudogenização, que teriam desencadeado a expansão da família. A perda, aquisição e descarte dos motivos conservados entre as novas sequências *Dof* provavelmente marcam o mecanismo de formação de agrupamentos distintos (subfamílias) de genes *Dof* filogeneticamente relacionados. Considerando-se essa hipótese, ao comparar várias famílias de genes entre diferentes espécies, é comum encontrar grupos de genes que são coletivamente ortólogos, indicando duplicações de genes durante a evolução. Nesta situação, o

conhecimento da função dos genes de certos membros permite a confirmação de parálogos e ortólogos, caso contrário, seria difícil inferir apenas através de topologias de árvores. Este parece ser o caso de muitos genes *Dof* entre *Arabidopsis*, *Populus* e *Vitis* como PtDOF38, PtDOF40, VvDof19 e VvDof20 no VII MCOG; VvDof14, VvDof15, PtDOF4 e PtDOF8 no MCOG I; VvDof6, VvDof7, PtDOF22 e PtDOF39 no MCOG VI (Figura 3; Capítulo III). Estes genes apresentam um elevado grau de similaridade de sequência com os padrões quase idênticos de motivos da estrutura da proteína. No caso dos pares parálogos de videira VvDof6-VvDof7 e VvDof19-VvDof20, ambos têm padrões muito semelhantes de expressão gênica, com um pico no órgão reprodutivo gema, uma indicação possível de diversificação por subfuncionalização. Por outro lado, uma pseudogenização poderia estar ocorrendo no par de genes parálogos VvDof14-VvDof15, pois, apesar de algumas tentativas, nenhuma expressão foi detectada em qualquer tecido testado para VvDof14. Um par de genes de parálogos de *Arabidopsis* nomeado AtOBP1 e AtDOF5.8 está próximo de VvDof6 e VvDof7 no MCOG VI. AtOBP1 e AtDOF5.8 mostraram-se importantes como reguladores de crescimento e desenvolvimento de *A. thaliana*, sendo expressos principalmente na fase conhecida como 1-5 de folhas roseta (Chawade et al. 2007; Moreno-Risueño et al. 2007; Skirycz et al., 2008).

Conforme mostrado na Figura 4 (Capítulo III), além do domínio Dof, uma infinidade de outros motivos é compartilhado entre estas proteínas. É exatamente a presença, a ausência e a posição desses diferentes motivos, que podem definir a relevância funcional de cada fator Dof. Isto é particularmente importante quando se discute a função biológica potencial dessas proteínas. Considerando o caso descrito acima, a relação filogenética observada para esses genes pode refletir a função de genes conservados. Assim, é pode-se sugerir que VvDof6, VvDof7 e AtOBP1 e AtDOF5.8 de *A. thaliana* por exemplo, podem compartilhar funções semelhantes durante o desenvolvimento da planta. Embora uma extensa anotação tenha sido realizada em *A. thaliana* desde o lançamento do seu genoma sequenciado (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) pouco se sabe sobre as funções da família de fatores de transcrição Dof nesta espécie. Os ortólogos de *A. thaliana* já caracterizados poderiam indicar uma função para os Dof identificados na videira, ou confirmar o seu padrão de expressão em diferentes tecidos. Entretanto, entre os três genes ortólogos representantes de Dof encontrados entre *Vitis* e *A. thaliana*, nenhum inclui fatores de transcrição já bem caracterizados em *A. thaliana* tais como COG1, DAG1/DAG2, HPPBF, denominados

øBP1-3, HCA2, CDF1-5 (revista em Yanagisawa, 2002 e 2004; Gualberti et al., 2002; Kang et al., 2003; Lijavetzky et al., 2003, Ward et al., 2005; Skirycz et al., 2006 e 2008; Fornara et al. 2009; Gabriele et al. de 2009, Guo et al., 2009).

No entanto, é importante salientar que foi recentemente demonstrado que a série de genes *Dof* CDF1-5 de *A. thaliana* são essenciais para conferir uma resposta ao fotoperíodo de floração, reprimindo a transcrição de CONSTANS, agrupadas junto ao MCOG VII (Figure 3; Capítulo III). Coincidentemente, cinco genes *Dof* de videira (VvDof18-22) de estrutura similar ao motivo da proteína agruparam no mesmo MCOG VII, compartilhando posições próximas na árvore, tornando-os bons candidatos potencialmente associados à atividade funcional similar em uvas.

Assim considerando o grande número de genes *Dof* que são agrupados em cada cluster, e a falta de dados sobre as suas funções, é prematuro assumir funções similares de ortólogos em videira. O acúmulo de mRNA de cada gene medida por RT-qPCR (Figura 9A-V; Anexo II) é a única informação que temos sobre a sua especificidade de expressão, como um primeiro passo para a definição das suas funções preliminares e a associação desses genes com processos específicos de desenvolvimento da videira.

Neste trabalho foi possível identificar um conjunto de prováveis genes *Dof* em videira. A análise filogenética resultou na identificação de sete grandes grupos de genes ortólogos que contém os membros das três espécies de plantas, cujos genomas foram completamente sequenciados. Nossos resultados confirmam que a diversificação e as duplicações recorrentes de um ancestral *Dof* pode ter levado à formação desta complexa família de fatores de transcrição específicos para Viridiplantae. Em vista de importantes eventos de duplicação do genoma levando à redundância de gene na história da diversificação de plantas (veja Jaillon et al. 2007), uma combinação de relações filogenéticas com dados funcionais será fundamental para estabelecer efetivamente papéis conservados ou divergentes dos genes da família *Dof* de videira e em outras espécies de plantas.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi realizado um estudo visando a identificação de genes envolvidos no desenvolvimento inicial do fruto de uma cultivar de uva de mesa apirênica em videira. Para tanto, foi utilizada a cultivar de uva de mesa sem semente Sultanina, principal genótipo doador da apirenia, com a finalidade de contribuir para o melhor entendimento dos processos associados ao desenvolvimento do fruto sem semente nesta espécie. Além disso, foi estudado o perfil de expressão de uma família de fatores de transcrição (Dof) envolvidos em diversas funções biológicas específicas de plantas e até hoje não caracterizados em videira. O perfil de expressão desta família gênica foi avaliado em nove órgãos da videira. Uma análise filogenética destes genes foi realizada, comparando com os seus homólogos em *A. thaliana*, *Populus* e *Clamydomonas*. A partir desse trabalho, foi possível reunir um conjunto de resultados:

(1) Utilizando uma estratégia de hibridização subtrativa modificada de RDA (BRAT) foram construídas de três bibliotecas específicas durante o desenvolvimento inicial do fruto: estabelecimento do fruto (DS0), quatro semanas após DS0 (DS4) e oito semanas após DS0 (DS8). Constituindo os cDNAs representativos dos genes mais diferencialmente expressos em cada um dos estádios;

(2) Dentre os genes candidatos selecionados entre os diferencialmente expressos, nossos resultados indicam que os genes que codificam (i) VvUBP1, (ii) VvRIP1, (iii) VvP450, (iv) VvDOF1; (v) VvERF1, e (vi) VvGID1L1 são os mais promissores quando se considera o desenvolvimento de frutos da cv. Sultanina sem sementes;

(3) Uma análise mais aprofundada da família de fatores de transcrição Dof de videira resultou na identificação de sete grandes grupos de genes ortólogos entre o genoma de *Vitis*, *Populus* e *Arabidopsis*. Uma vez estabelecidas as relações filogenéticas, será possível estabelecer uma ligação dos papéis conservados e divergentes dos genes da família Dof em videira e realizar a combinação com dados funcionais.

Como inicialmente proposto, este trabalho permitiu executar em escala genômica, o primeiro projeto de pesquisa visando identificar genes com perfil de expressão diferencial durante a maturação do fruto da videira apirênica no país. O número expressivo de resultados assegura o início de uma linha de pesquisa de longo prazo que visa o desenvolvimento de tecnologias e disponibilização de ferramentas para o melhoramento genético da videira, inclusive podendo ser objetos de patentes.

Destaca-se como perspectiva de continuação das atividades vinculadas à realização desse trabalho: (i) Realizar a comparação por RT-qPCR entre os perfis de expressão em uvas com sementes e sem sementes; (ii) a prospecção de genes candidatos para o desenvolvimento de ferramentas para o melhoramento genético, seleção assistida e transformação genética visando a alteração de características do fruto em sistemas de plantas modelo (tabaco, tomate e *A. thaliana*); (iii) localização tissular e subcelular da expressão de genes tecido-específicos utilizando métodos como a hibridização *in situ* e micro-dissecção das partes do fruto combinada com q-PCR e (iv) identificação e isolamento de promotores tecido-específicos que permitam o controle da expressão de genes de interesse agrônomico em videiras transgênicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguero C, Vigliocco A, Abdala G, Tizio R (2000) Effect of gibberellic acid and uniconazol on embryo abortion in the Stenospermocarpic Grape cultivars Emperatriz and Perlon. *Plant Growth Regul.* 30: 9-16
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadriab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301:653-657
- Angeles-Castillejo M, Amieur N, Dumas-Gaudot E, Rubiales D, Jorin JV (2004) A proteomic approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobanchaceae*) in pea (*Pisum sativum*). *Phytochemistry* 65:1817-1828
- Arteaga-Vázquez M, Caballero-Pérez J, Vielle-Calzada JP (2006) A family of MicroRNAs present in plants and animals. *The Plant Cell* 18:3355-3369
- Azama K, Abe S, Sugimoto H, Davies E (2003) Lysine-containing proteins in maize endosperm: a major contribution from cytoskeleton-associated carbohydrate metabolizing enzymes. *Planta* 217: 628-638
- Banno H, Ikeda Y, Niu QW, Chua NH (2001) Overexpression of *Arabidopsis thaliana* *ESR1* induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell* 13: 2609–2618
- Ben-Naim O, Eshed R, Parnis A, Teper-Bamnolker P, Shalit A, Coupland G, Samach A, Lifschitz E (2006) The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J.* 46: 462-476
- Ben-Tal Y (1990) Effects of gibberellin treatments on ripening and berry drop from *Thompson Seedless* grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:142-146
- Bewley JD, Black M (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination*, 2nd ed. Plenum, New York.
- Bouquet A, Danglot Y (1996) Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* 35:35-42
- Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhanga L, Hattori J, Liu C-M, van Lammerend AAM, Miki BLA, Custers, JBM, van Lookeren Campagne, MM (2002) Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell* 14:1737-1749
- Bukau B, Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351-366

- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *The plant Cell* 15: 2165-2180
- Chawade A, Bräutigam M, Lindlöf A, Olsson O, Olsson B (2007) Putative cold acclimation pathways in *A. thaliana* identified by a combined analysis of mRNA co-expression patterns, promoter motifs and transcription factors. *BMC Genomics* 8:304
- Chen W, Chao G, Singh KB (1996) The promoter of an H₂O₂-inducible, *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF and OBP1-binding sites. *Plant J* 10: 955-966
- Cheng XF, Wang ZY (2005) Overexpression of COL9, a CONSTANS-LIKE gene, delays flowering by reducing expression of CO and FT in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.* 43:758-768
- Chuck G, Muszynski M, Kellogg E, Hake S, Schmidt RJ (2002) The control of spikelet meristem identity by the *branched silkless1* gene in maize. *Science* 298: 1238-1241
- Cronjé MJ, Weir IE, Bornman L (2004) Salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 induction correlates with reduced apoptosis in tobacco protoplasts. *Cytometry* 61A: 76-87
- De Paolis A, Sabatini S, De Pascalis L, Costantino P, Capone I (1996) A rolB regulatory factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins. *Plant J.* 10:215-223
- Davies C, Robinson SP (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening: Cloning and characterisation of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol.* 122: 803-812
- Deepak S, Shailasree S, Kini RK, Hause B, Shetty SH, Mithofer A (2007) Role of hydroxyproline-rich glycoproteins in resistance of pearl millet against downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*, *Planta* 323-333
- Desikan R, Clarke A, Hancock JT, Neill SJ (1999) H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 50: 1863-1866
- Desikan R, Hancock JT, Ichimura K, Shinozaki K, Neill SJ (2001) Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol.* 126: 1579-1587
- Diaz-Riquelme J, Lijavetzky D, Martínez-Zapater JM, Carmona MJ (2009) Genome-wide analysis of MIKCC-type MADS box genes in grapevine. *Plant Physiol.* 149: 354-369
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L, encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J* 33: 751-763

- Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, Oakes MP, Tucker WQJ, Gerentes D, Perez P, Smyth DR (1996) A *INTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* 8, 155-168
- Filkelstein R, Gibson SI (2002) ABA and sugar interactions regulating development: “cross-talk” or “voices in a crowd”? *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 26-32
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151:1531-1545
- Fornara F, Panigrahi KC, Gissot L, Sauerbrunn N, Rühl M, Jarillo JA, Coupland G (2009) *Arabidopsis thaliana* DOF transcription factors act redundantly to reduce *CONSTANS* expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Dev. Cell* 17(1): 75-86
- Gabriele S, Rizza A, Martone J, Circelli P, Costantino P, Vittorioso P (2009) The Dof protein DAG1 mediates *PIL5* activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene *AtGA3ox1*. *Plant J.* 1365-313X
- Gilbert W, de Souza SJ, Long M (1997) Origin of genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7698-7703
- Gu Y, Yang C, Thara YK, Zhou J, Martin GB (2000) *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the *Pto* kinase. *Plant Cell* 12: 771-786
- Gualberti G, Papi M, Bellucci L, Ricci I, Bouchez D, Camilleri C, Costantino P, Vittorioso P (2002) Mutations in the Dof zinc finger genes *DAG2* and *DAG1* influence with opposite effects the germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* 14: 1253-1263
- Gueydan C, Wauquier C, De Mees C, Huez G, Kruys V (2002) Identification of Ribosomal Proteins Specific to Higher Eukaryotic Organisms. *J. Biol. Chem.* 277: 45034-45040
- Guo Y, Qin G, Gu H, Qu LJ (2009) *Dof5.6/HCA2*, a Dof transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 10.1105/tpc.108.064139
- Hanania U, Velcheva M, OR E, Flaishman M, Sahar N, Perl A (2007) Silencing of chaperonin 21, that was differentially expressed in inflorescence of seedless and seeded grapes, promoted seed abortion in tobacco and tomato fruits. *Transgenic Res.* 16:515-525
- Hanania U, Velcheva M, Sahar N, Flaishman M, Or E, Degani O, Perl A (2009) The ubiquitin extension protein *S27a* is differentially expressed in developing flower organs of *Thompson* seedless versus *Thompson seeded* grape isogenic clones. *Plant Cell Rep.* 28:1033-1042
- Hong JC, Cheong YH, Nagao RT, Bahk JD, Cho MJ, Key JL (1994) Isolation and characterization of three soybean extensin cDNAs. *Plant Physiol.* 104:793-796

Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA, Kay SA (2005) FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 309: 293-7

Ito T, Meyerowitz E (2000) Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, CYP78A9, induces large and seedless fruit in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 12:1541-1550

Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Huguene P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pè ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quétier F, Wincker P (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463-467

Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling. *Biochem. J.* 353:417-439

Kalifa Y, Perlson E, Gilad A, Konrad Z, Scolnik PA, Bar-Zvi D (2004) Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant Cell Environ.* 27: 1459-1468

Kamada M, Higashitani A, Ishioka N (2005) Proteomic analysis of *Arabidopsis* root gravitropism. *Biological Sciences in Space* 19: 148-154

Kang H-G, Foley RC, Oñate-Sánchez L, Lin C, Singh KB (2003) Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. *Plant J.* 35: 362-372

Kim SL, Lee S, Kim HJ, Nam HG, An G (2007) *OsMADS51* is a shortday Flowering promoter that functions upstream of *Ehd1*, *Os-MADS14*, and *Hd3a*. *Plant Physiol* 145:1484-1494

Kisu Y, Ono T, Shimofurutani N, Suzuki M, Esaka M (1998) Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. *Plant Cell Physiol.* 39, 1054-1064

Lambermon MHL, Simpson GG, Wiczorek Kirk DA, Hemmings-Mieszczak M, Klahre U, Filipowicz W (2000) UBP1, a novel hnRNP-like protein that functions at multiple steps of higher plant nuclear pre-mRNA maturation. *EMBO J.* 19:1638-1649

Ledbetter CA, Shonnard CB (1990) Improved seed development and germination of stenospermocarpic grapes by plant growth regulators. *J. Hort. Sci.* 65: 269-274

Ledbetter CA, Ramning DW (1989) Seedlessness in grapes. *Hort. Rev.* 11:159-184

- Lijavetzky D, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J (2003) Genome wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis thaliana* Dof gene families. *BMC Evol. Biol.* 3: 17
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 10: 1391-1406
- Lynch M, Force A (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154:459-473
- Mandelli F (2005) Comportamento Meteorológico e sua Influência na Vindima de 2005 na Serra Gaúcha. Comunicado Técnico, 6p, Embrapa Uva e Vinho.
- Mandelli F (2006) Comportamento Meteorológico e sua Influência na Vindima de 2006 na Serra Gaúcha. Comunicado Técnico, 6p, Embrapa Uva e Vinho.
- Mandelli F (2008) Comportamento Meteorológico e sua Influência na Vindima de 2008 na Serra Gaúcha. Comunicado Técnico, 4p, Embrapa Uva e Vinho.
- Maskin L, Gubesblat GE, Moreno JE, Carrari FO, Frankel N, Sambade A, Rossi M, Iusem ND (2001) Differential expression of the members of the *Asr* gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Sci.* 161: 739-746
- McCright B, Brothman AR, Virshup DM (1996) Assignment of human protein phosphatase 2A regulatory subunit genes B56a, B56b, B56c, B56d, and B56e (PPP2R5A-PPP2R5E), highly expressed in muscle and brain, to chromosome regions 1q41, 11q12, 3p21, 6p21.1, and 7p11.2p12. *Genomics* 36:168-170
- Mena M, Cejudo FJ, Isabel-Lamoneda I, Carbonero P (2002) A Role for the Dof Transcription Factor BPBF in the Regulation of Gibberellin-Responsive Genes in Barley Aleurone. *Plant Physiol.* 130:111-119
- Mena M, Vicente-Carbajosa J, Schmidt RJ, Carbonero P (1998) An endosperm-specific Dof protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamins-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm. *Plant J.* 16: 53-62
- Mishra SK, Tripp J, Winkelhaus S, Tschiersch B, Theres K, Nover L, Scharf K-D (2002) In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes and Development* 16:1555-1567
- Mizoguchi T, Ichimura K, Shinozaki K (1997) Environmental stress response in plants: The role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnol.* 15: 15-19
- Moose SP, Sisco PH (1996) Glossy15, an *Ap2*-like gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. *Genes & Development* 10(23), 3018

- Moreno-Risueno MA, Martinez M, Vicente-Carbajosa J, Carbonero P (2007) The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. *Mol. Genet. Genomics* 277: 379-390
- Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) "Ethylene-Inducible DNA Binding Proteins That Interact with an Ethylene-Responsive Element." *The Plant Cell* 7:173-182
- Ohno S (1970) Evolution by gene duplication. Springer-Verlag, New York.
- Ohtsuka K, Hata M (2000) Molecular chaperones function of mammalian Hsp70 and Hsp40 - a review. *International Journal of Hyperthermia* 16: 231-245
- Papi M, Sabatini S, Bouchez D, Camilleri C, Costantino P, Vittorioso P (2000) Identification and disruption of *Arabidopsis thaliana* zinc finger gene controlling seed germination. *Genes Dev.* 14: 28-33
- Papi M, Sabatini S, Altamura MM, Hennig L, Schäfer E, Costantino P, Vittorioso P (2002) Inactivation of the phloem-specific Dof zinc finger gene *DAG1* affects response to light and integrity of the testa of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiol.* 128, 411-417
- Park DH, Lim PO, Kim JS, Cho DS, Hong SH, Nam HG (2003) The *Arabidopsis thaliana* COG1 gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *Plant J.* 34: 161-171
- Perez FJ, Viani C, Retamales J (2000) Bioactive gibberellins in seeded and seedless grapes: identification and changes in content during berry development. *Amer. J. Enol. Vitic.* 51:315-318
- Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424:85-88
- Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B (2001) Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *Plant J.* 28: 455-464
- Reynolds AG, Roller JN, Forgione A, De Savigny C (2006) Gibberellic acid and basal leaf removal: implications for fruit maturity, vestigial seed development, and sensory attributes of Sovereign Coronation table grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:41-53
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang CZ, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu GL (2000). *Arabidopsis thaliana* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110
- Robson F, Costa MM, Hepworth SR, Vizir I, Pineiro M, Reeves PH, Putterill J, Coupland G (2001) Functional importance of conserved domains in the Xowering-time gene CONSTANS demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J.* 28:619-631

- Skirycz A, Reichelt M, Burow M, Birkemeyer C, Rolcik J, Kopka J, Zanon MI, Gershenzon J, Strnad M, Szopa J, Mueller-Roeber B, Witt I (2006) DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 47:10-24
- Skirycz A, Radziejowski A, Busch W, Hannah MA, Czeszejko J, Kwaśniewski M, Zanon MI, Lohmann JU, De Veylder L, Witt I, Mueller-Roeber B (2008) The DOF transcription factor OBP1 is involved in cell cycle regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 56:779-792
- Staiger D, Zecca L, Wiczyński DA, Apel K, Eckstein L (2003) The circadian clock regulated RNA binding protein AtGRP7 auto regulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. *Plant J.* 33:361-371
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1035-1040
- Stout AB (1936) Seedlessness in grapes. *New York Agriculture Experimental Station Technology Bulletin*, New York, v. 238, n. 33, p. 1-65
- Symons GM, Davies C, Shavrukov Y, Dry IB, Reid JB, Thomas MR (2006) Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiol.* 140:150-158
- The Arabidopsis Genome Initiative (2001) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 414: 796-815
- Thornton JW, DeSalle R (2000) Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. *Annu Rev Genomics Hum. Genet.* 1: 41-73
- van der Fits L, Memelink J (2000) ORCA3, a jasmonate responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 288: 295-297
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE*, 2 (12): e1326
- Vicente-carbajosa J, Moose SP, Parsons RL, Schmidt, RJ (1997) A maize zinc-finger protein binds the prolamins box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 7685-7690
- Vierling E (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579-620
- Ward JM, Cufu CA, Denzel MA, Neff MM (2005) The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17: 475-485
- Wang BB, Brendel V (2004) The ASRG database: identification and survey of *Arabidopsis thaliana* genes involved in pre-mRNA splicing. *Genome Biol.* 5:R102

- Wang H-J, Hsu C-M, Jauh GY, Wang C-S (2005) A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiol Plant*. 123: 314-320
- Washio K (2001) Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grains. *Biochim. Biophys. Acta* 1520: 54-62
- Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierc J, Samach A, Coupland G (2006) CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate Flowering of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 18:2971-2984
- Yamamoto S, Suzuki K, Shinshi H (1999) Elicitor-responsive, ethylene-independent activation of GCC box-mediated transcription that is regulated by both protein phosphorylation and dephosphorylation in cultured tobacco cells. *Plant J*. 20: 571-579
- Yang C-Y, Chen Y-C Jauh GY, Wang C-S (2005) A Lily ASR Protein Involves Abscisic Acid Signaling and Confers Drought and Salt Resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 139: 836-846
- Yanagisawa S. (1995) A novel DNA binding domain that may form a single zinc finger motif. *Nucleic Acid Res*. 23: 3403-3410
- Yanagisawa S, Sheen J (1998) Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell* 10: 75-89
- Yanagisawa S (2000) Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J*. 21: 281-288
- Yanagisawa S (2002) The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*. 7: 555-560
- Yanagisawa S. (2004) Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant Cell Physiol*. 45: 386-391
- Yang, K., Liu, Y., and Zhang, S. 2001. Activation of a mitogenactivated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 98: 741-746
- Yang X, Tuskan GA, Cheng MZ (2006) Divergence of the Dof gene families in poplar, *Arabidopsis thaliana*, and rice suggests multiple modes of gene evolution after duplication. *Plant Physiol*. 142: 820-30
- Zhang B, Chen W, Foley RC, Buttner M, Singh KB (1995) Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to *ocs* element promoter sequences. *Plant Cell* 7: 2241-2252
- Zhang JY, Broeckling CD, Blancaflor EB, Sledge MK, Sumner LW, Wang ZY (2005) Overexpression of *WXP1*, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant J*. 42: 689-707

ANEXOS

ANEXO I

TABELAS

Tabela II. Quadro final de clones sequenciados por biblioteca.

Biblioteca	Total de clones sequenciados	Total de clones aceitos*
DS0	768	538
DS4	984	457
DS8	748	559
TOTAL	2500	1554

*Representam sequências de TDFs após eliminação da sequência do vetor, com qualidade ≥ 20 e extensão ≥ 80 pb.

Tabela III. Quadro demonstrativo de distribuição de TDFs nas diferentes bibliotecas obtidas após análise bioinformática

Biblioteca	DS0	DS4	DS8	Total
Clones sequenciados	538	457	559	1554
aceitos				
Redundância (%)	81,9	78,0	67,3	75,7
Clusters	17	37	15	69
Singletons	158	132	426	726

Tabela IV. Genes selecionados potencialmente envolvidos na regulação do desenvolvimento inicial da cv. de uva Sultanina através da estratégia BRAT.

Nome do Clone	Categoria Funcional	Anotação no Genoscope	Melhor similaridade no GenBank/Espécie	Potencial Identificação Funcional	Biblioteca	Localização Cromossômica
VvUBP1* [#]	Ligação à nucleotídeo	GSVIVT00016402001	gi 52126053 gb CV197216.1 (...)	<i>Oligouridylate binding protein-like</i>	FS/RDA	Chr_11
VvFS41*	Biosíntese de proteína	GSVIVT00025456001	gi 110705930 gb EE083344.1 (<i>Vitis vinifera</i>)	<i>DNA binding protein</i>	FS/RDA	Chr_8
VvPHP1*	Proteína de ligação a choque térmico	GSVIVT00016875001	lcl TC62058	<i>Heat shock protein 70</i>	FS/RDA	Chr_11
VvAHS1	Proteínas de transporte de membrana	GSVIVT00035207001	lcl TC52490 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>auxin:hydrogen symporter</i>	FS/RDA	Chr_10
VvSCP1	Processamento de mRNA e rRNA	Scaffold_4	gi 52126053 gb CV197216.1 (<i>Juglans regia</i>)	<i>Seed coat from mid-season walnut embryos</i>	FS/RDA	Chr_19
VvCSS1	Resposta de hipersensibilidade em plantas	GSVIVT00026172001	gi 110397235 gb EC962965.1 (<i>Vitis vinifera</i>)	<i>Cabernet Sauvignon seed normalized</i>	FS/RDA	Chr_15
VvRIP1* [#]	Sem ontologia definida	Scaffold_2539	lcl TC65996 (<i>Vitis vinifera</i>)	<i>Ripening induced protein</i>	DS4/RDA	Chr_6
VvP450* [#]	Atividade dependente de ATP	GSVIVT00001811001	lcl TC68767 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	<i>Cytochrome p450 like</i>	DS4/RDA	Chr_18
VvDOF1* [#]	Regulação da transcrição	GSVIVT00017546001	gnl BL_ORD_ID 24989 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>Dof one finger protein-like</i>	DS4/RDA	Chr_17
VvERF1*	Fator de transcrição	GSVIVT00032424001	gi 48428609 sp Q39127 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>Ethylene-responsive transcription factor TINY</i>	DS4/RDA	Chr_4
VvPPP2A	Ligações a ions de cálcio	GSVIVT00002241001	gnl BL_ORD_ID 275 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>putative protein phosphatase 2A</i>	DS4/RDA	Chr_14
VvCLP1* [#]	Ligação ao DNA e ligação à Metais de Zinco	GSVIVT00031464001	lcl TC56447 (...)	<i>CONSTANS-like protein 2</i>	DS8/RDA	Chr_11
VvGID1L1* [#]	Sem ontologia definida	GSVIVT00006107001	lcl TC67464 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>Probable gibberellin receptor</i>	DS8/RDA	Chr_14
VvFBA1* ⁺	Glicólise	GSVIVT00021665001	lcl TC61654 (<i>Oryza sativa</i>)	<i>Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme similar to UP Proline-rich protein</i>	DS8/RDA	Chr_8
VvUPP1* ⁺	Transporte de íon metálico	GSVIVT00012879001	lcl TC62127	<i>Vitis vinifera chloroplast chaperonin 21 gene</i>	DS8/RDA	ChrUn_random
VvCPN21*	Montagem de proteína	GSVIVT00016397001	gi 50660326 gb AY680699.1 (<i>Vitis vinifera</i>)	<i>Vitis vinifera chloroplast chaperonin 21 gene</i>	Hanania et al., 2007	Chr_11

* Genes eleitos para posteriores análises de expressão via qPCR; ⁺ Resultados da qPCR apresentados no Anexo I; [#] Genes testados em três anos/três safras.

Tabela V. Primers usados para análise de expressão qPCR por RDA.

Gene	Forward Primer 5' 3'	Reverse Primer 5' 3'
VvUBP1	TTCGTTGTAATTGGGCAACA	CGACATTTTCATGCACTTGG
VvFS41	GAGACATCCTCACCCCTGCTC	GACTATGACTGTTTTATCCTGA
VvPHP1	CATCCATCACCAACCCATTT	CCAACATGCAGTTCACCATC
VvAHS1	TGGCTGATAAGCTTGGCTTT	ATCTTCTCCATGGCTGGATG
VvSCP1	CAGAGAATCCGAGCATTTC	AATGTCGGTGGAGGTCAACT
VvCSS1	ACGTCGACTATCCATGAACG	AGATGAGTGGAGGGGATGTG
VvRIP1	GGATCCTCGTTAAGGGATTTAGA	CGCAAATTACCCAATCCTGA
VvP450	GCTCAACAGGGTCTTCTTTCC	AACGGCGGGAGTAACTATGA
VvDOF1	GAGAGTTCGATTTCCGCTCA	GAACCAGGCCTTGAAGTGTC
VvERF1	TTCATCGTCTCCGTCCTCTC	TGGGTGTCTGAAATTCGGGA
VvPPP2A	CACCGAGATCACGAGTTTCA	CCTCAAAGAGCACAGGCTCT
VvCLP1	TCGATATCGGAGAAGAACC	CCGGGGATGAGGAGGACT
VvGID1L1	CCCACCGTGGAAGAAAAGTA	TGAGGGGGTGTCTCTTTTG
VvFBA1	GAGGGAGGATCCGGAAGATAA	TTCATCAGTACTTGTAGTCCTTGAC
VvUPP1	GATCACCGACTCAACACCCA	TCTGTCACAGCGACACCC
VvCPN21	GGGACAGAGGTGGAGTTCAA	TTTCCTTGCTTGCCTCTGTT
ACTIN	CTTGCATCCCTCAGCACCTT	TCCTGTGGACAATGGATGGA
EF1	CGCCTGTCAATCTTGGTCAGTAT	AATGGCTATGCCCCTGTTCTG
SAND	CAACATCCTTTACCCATTGACAGA	GCATTTGATCCACTTGCAGATAAG
GAPDH	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA	CCACAGACTTCATCGGTGACA

ANEXO II

FIGURAS

BRAT – *Bulked Representation Analysis of Transcripts*

B1 – DS0 (Tester) vs. mistura equivalente de DS4 e DS8 (Driver)

B2 – DS4 (Tester) vs. mistura equivalente de DS0 e DS8 (Driver)

B3 – DS8 (Tester) vs. mistura equivalente de DS0 e DS4 (Driver)

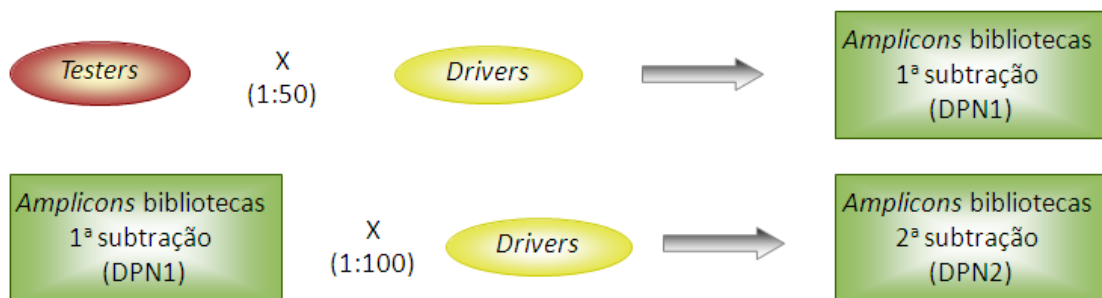
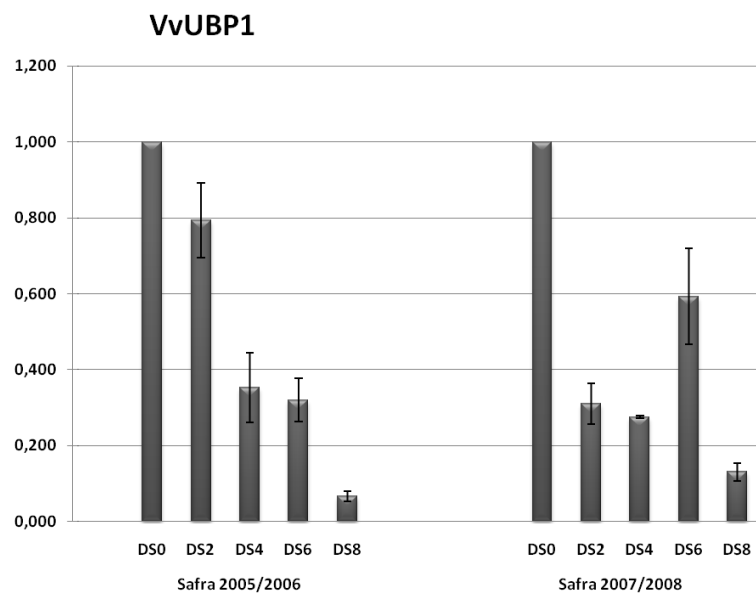


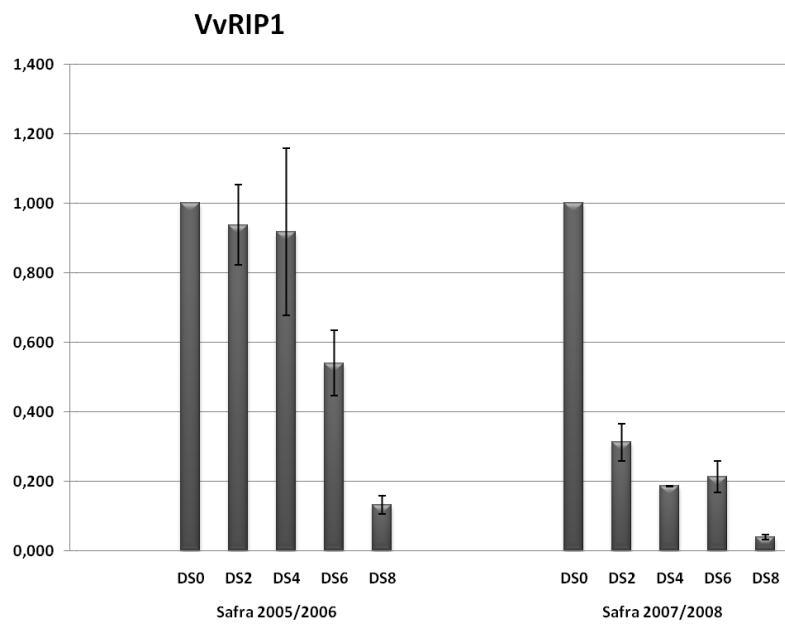
Figura 6. Estratégia de subtração de BRAT. B1, B2 e B3: bibliotecas 1, 2 e 3 respectivamente. DPN1 e DPN2 significam primeiro produto diferencial e segundo produto diferencial, respectivamente.

Figura 7

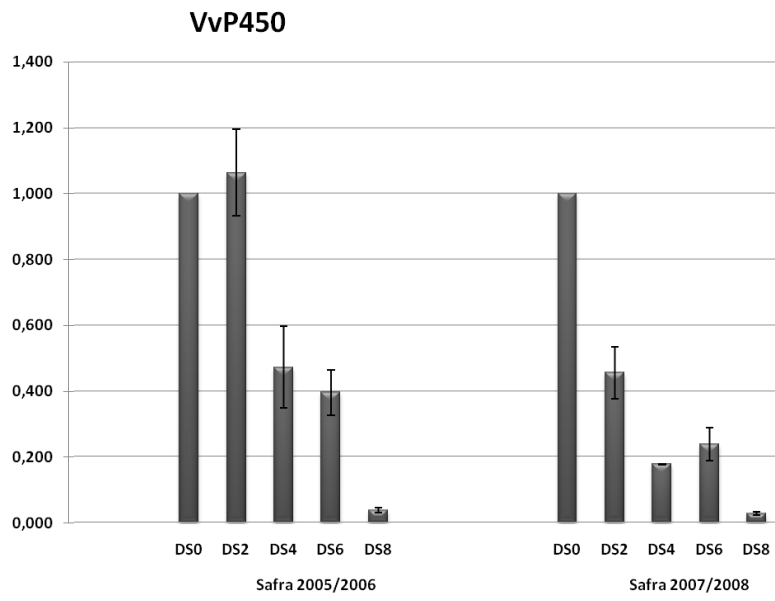
A



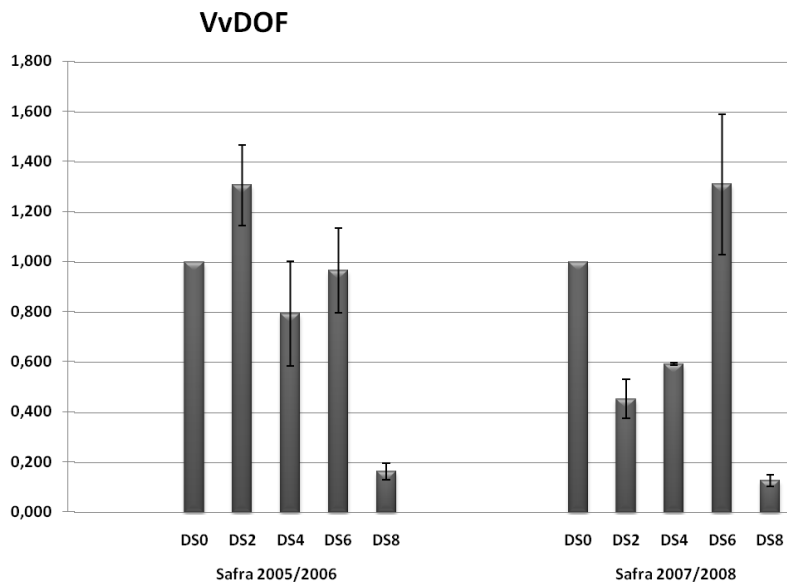
B



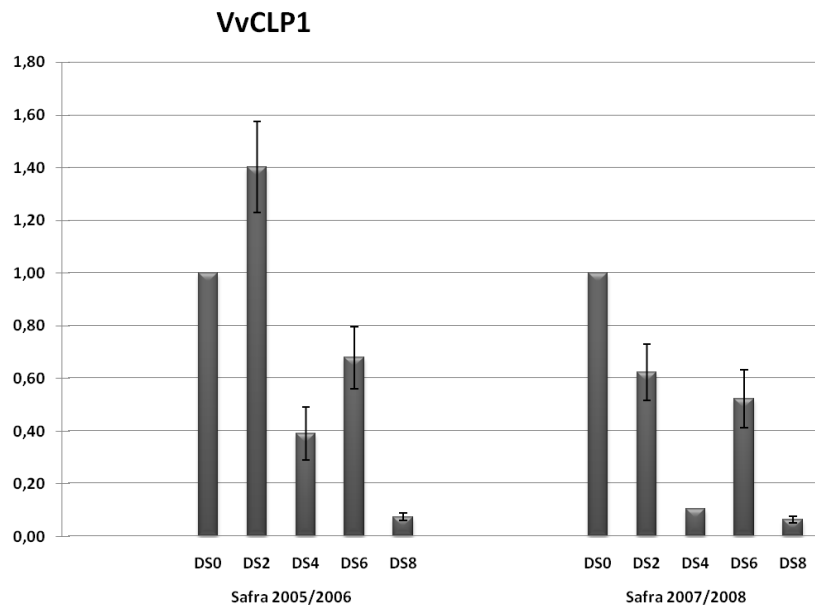
C



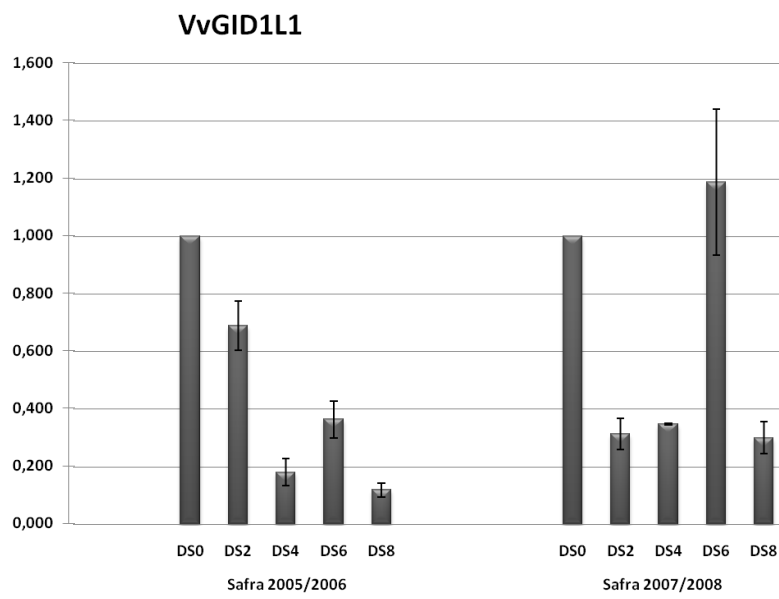
D



E



F



G

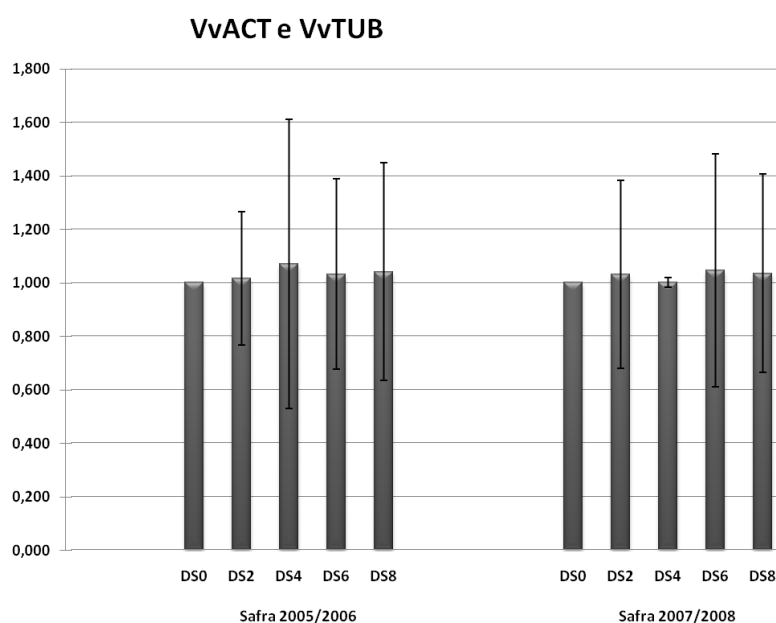
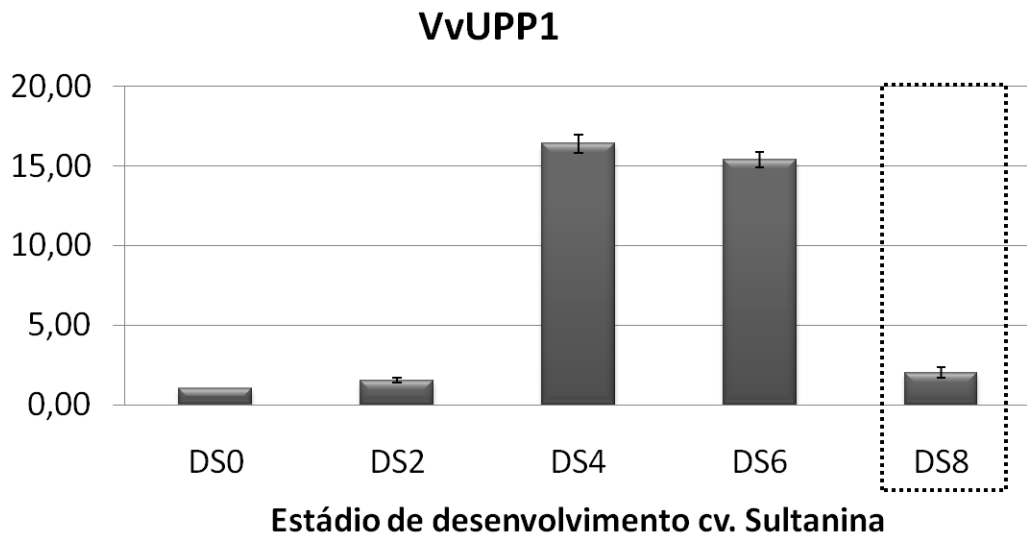


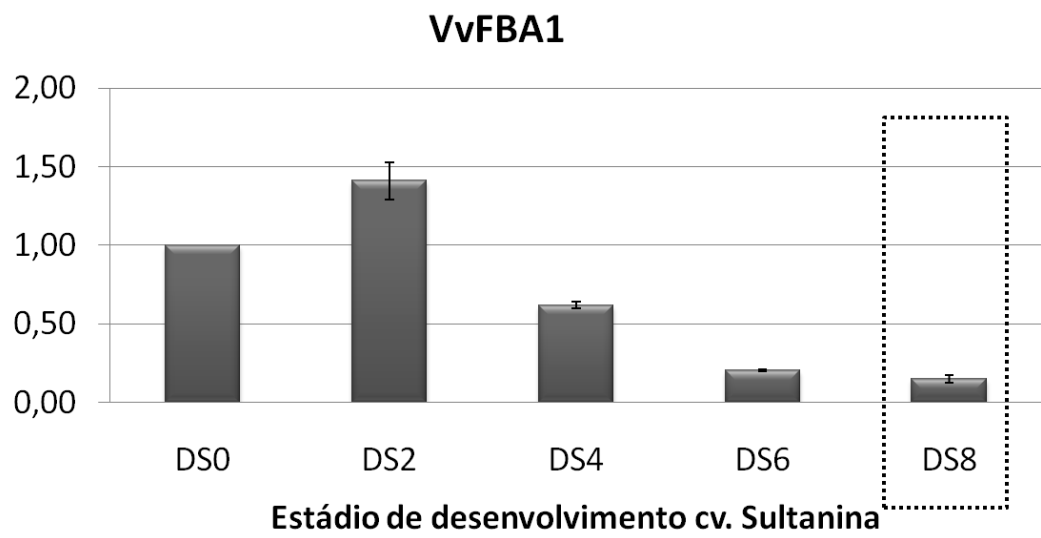
Figura 7. Expressão relativa de VvUBP1(A), VvRIP1(B), VvP450(C), VvDOF(D), VvCLP1(E) e VvGID1L1(F) medidas por PCR quantitativo em Tempo Real nos diferentes estádios de desenvolvimento durante a safra de 2005/2006 e 2007/2008. Estádios de desenvolvimento (DS) são representados no eixo X e a expressão relativa ao estágio DS0 no eixo Y. As expressões dos genes de referências VvACT e VvTUB (G) foram utilizadas para normalizar os valores de expressão dos genes candidatos.

Figura 8

A



B



C

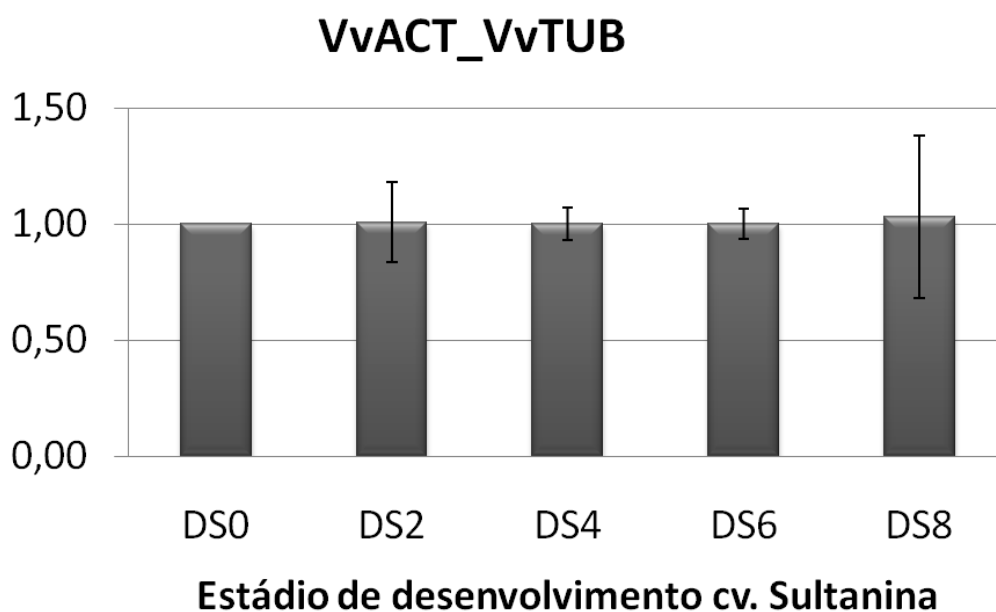
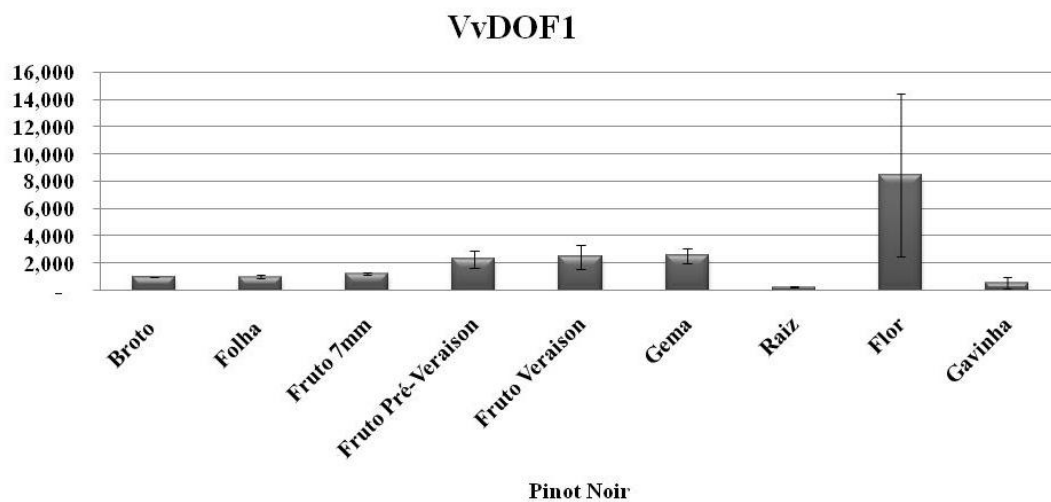


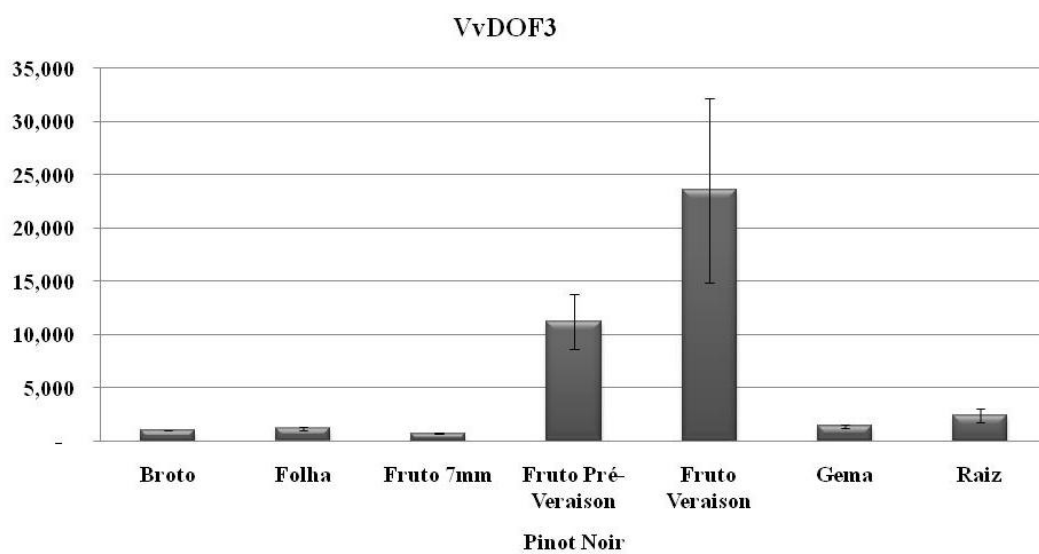
Figura 8. Expressão relativa de VvUPP1(A) e VvFBA1(B) medidas por PCR quantitativo em tempo real nos diferentes estádios de desenvolvimento durante a safra de 2004/2005. Estádios de desenvolvimento (DS) são representados no eixo X e a expressão relativa ao estágio DS0 no eixo Y. As expressões dos genes de referências VvACT e VvTUB (C) foram utilizadas para normalizar os valores de expressão dos genes candidatos. As barras marcadas por retângulos representam os estádios dos quais os genes candidatos foram isolados da estratégia BRAT.

Figura 9

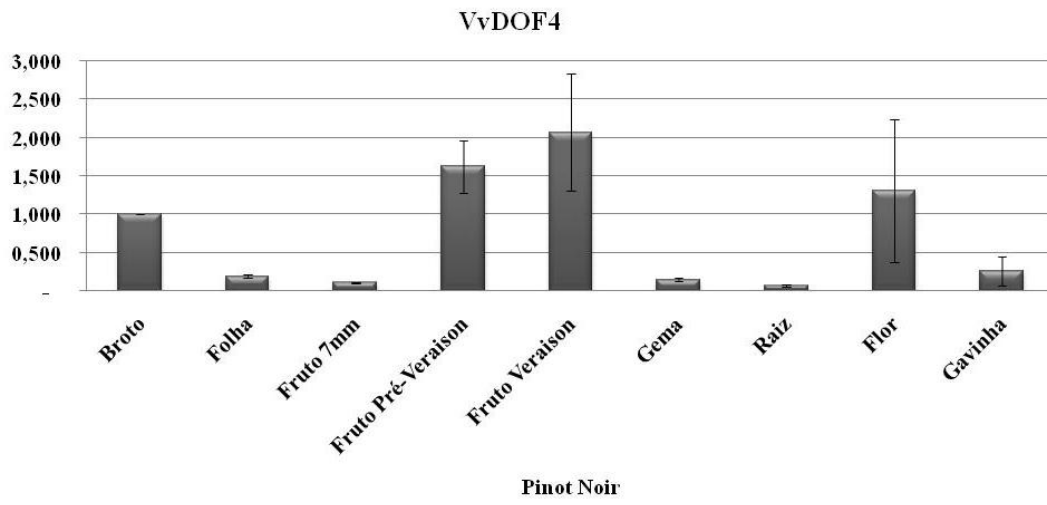
A



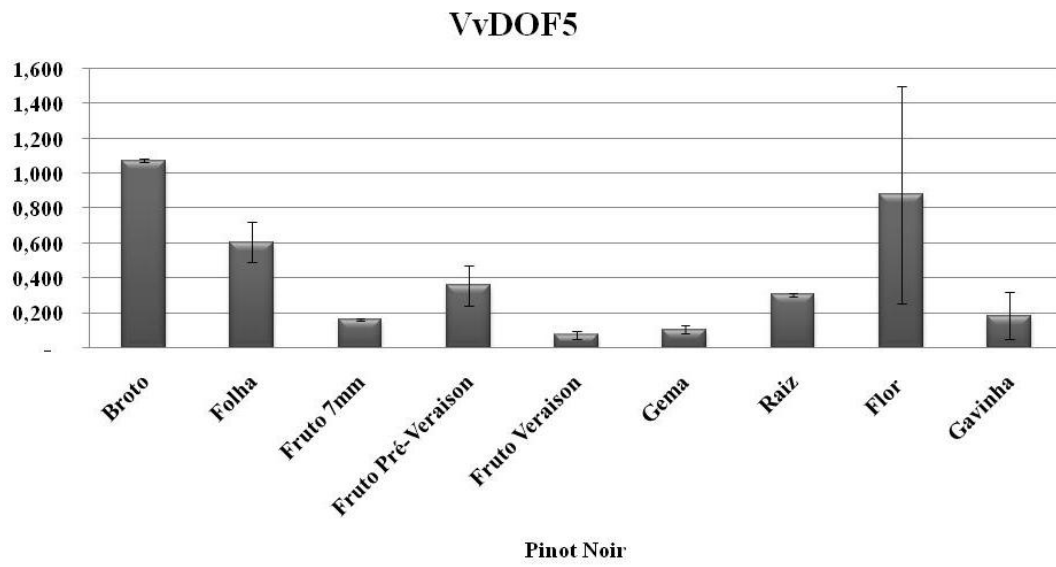
B



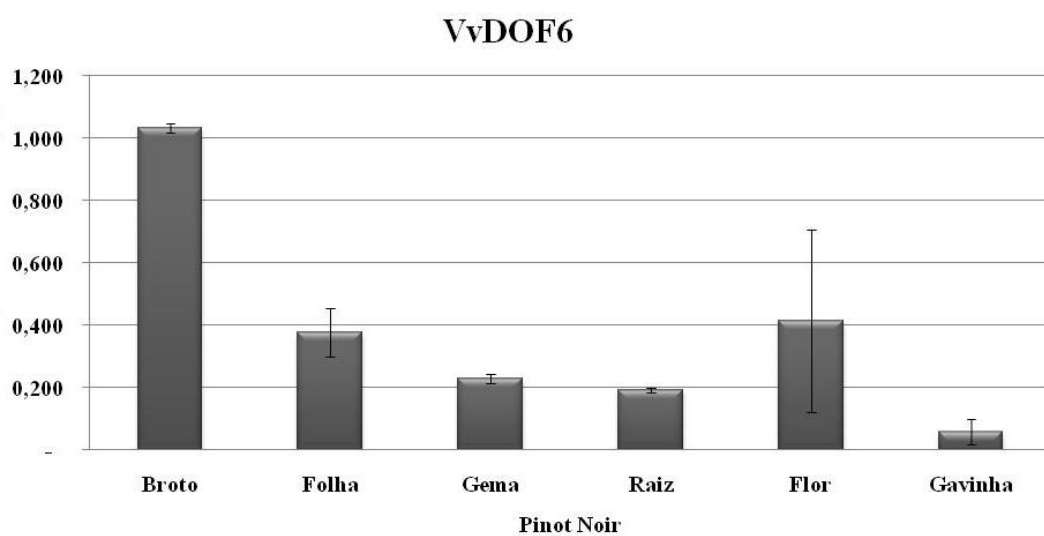
C



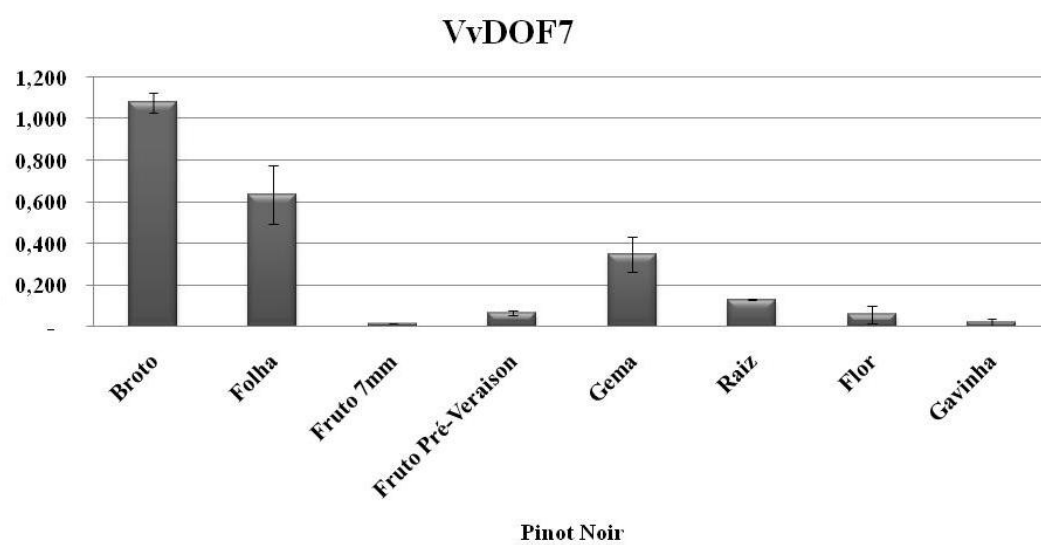
D



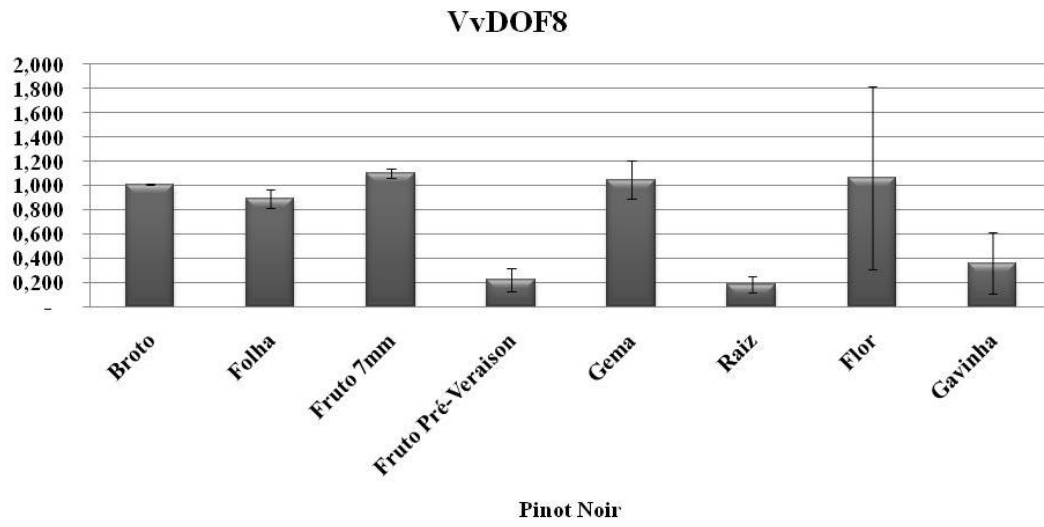
E



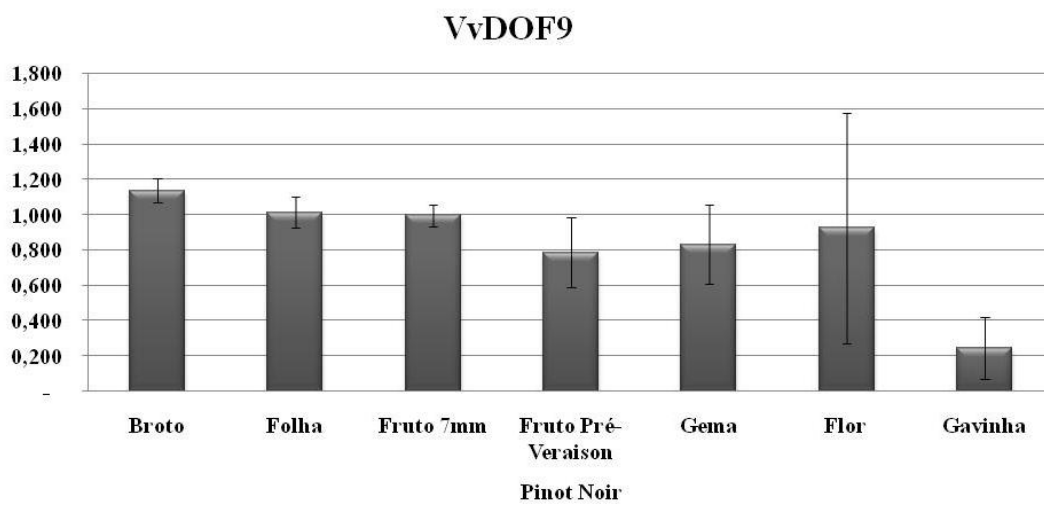
F



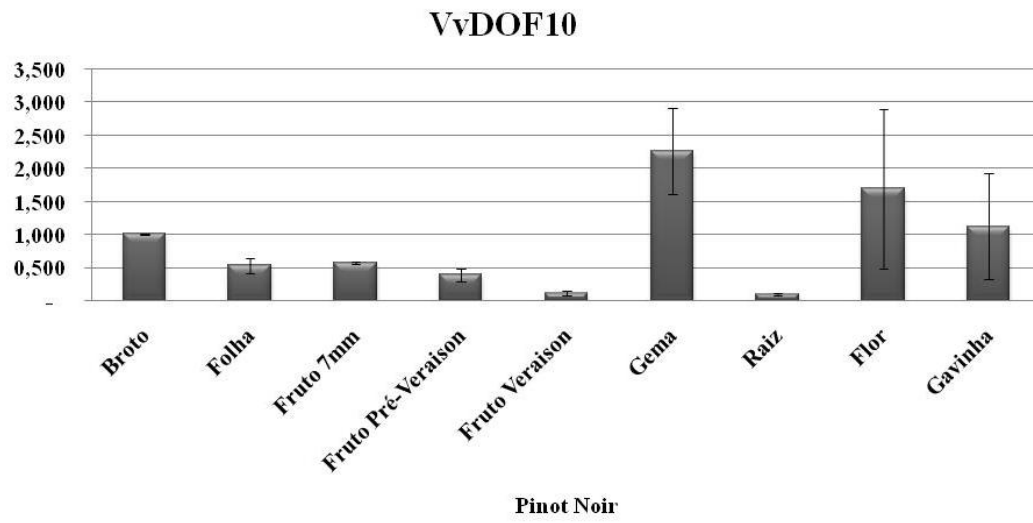
G



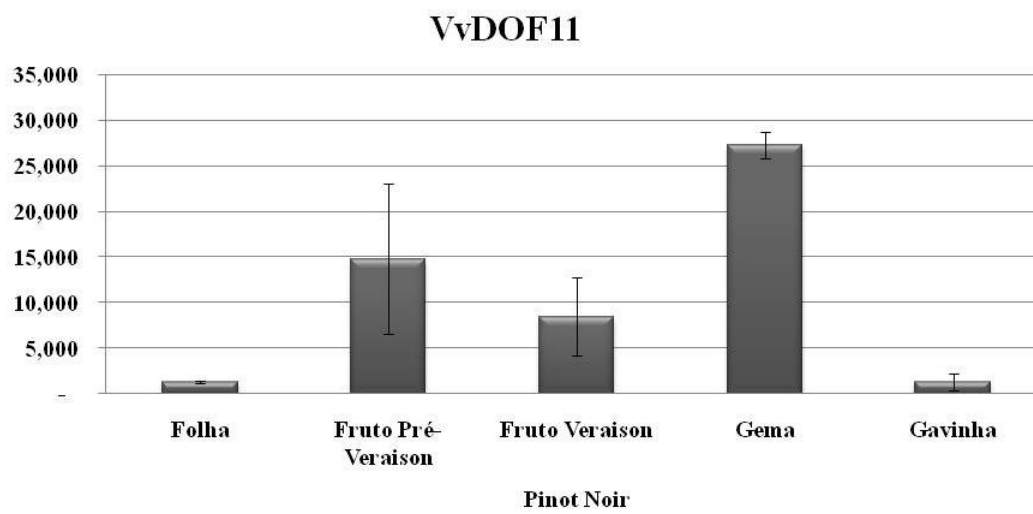
H



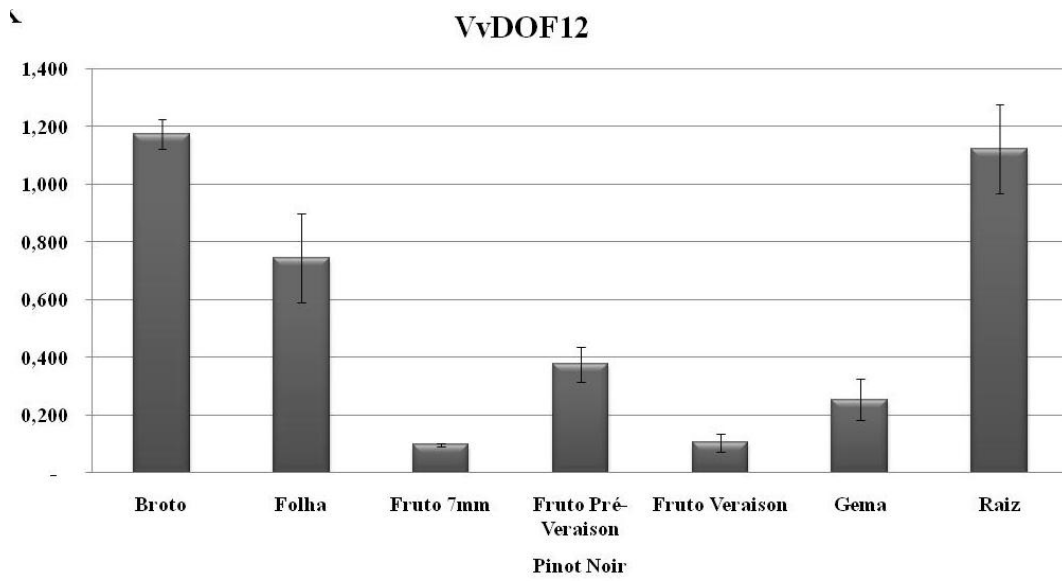
I



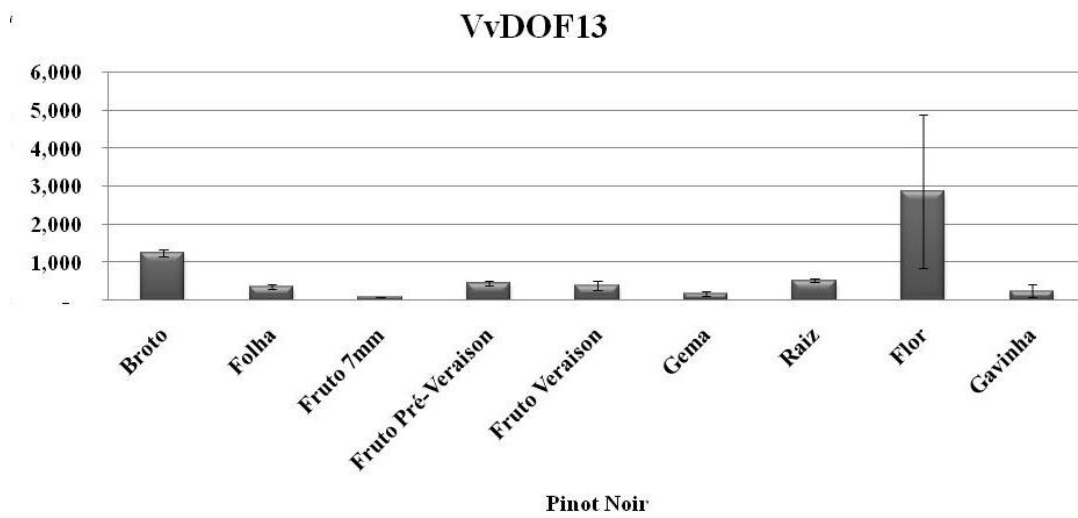
J



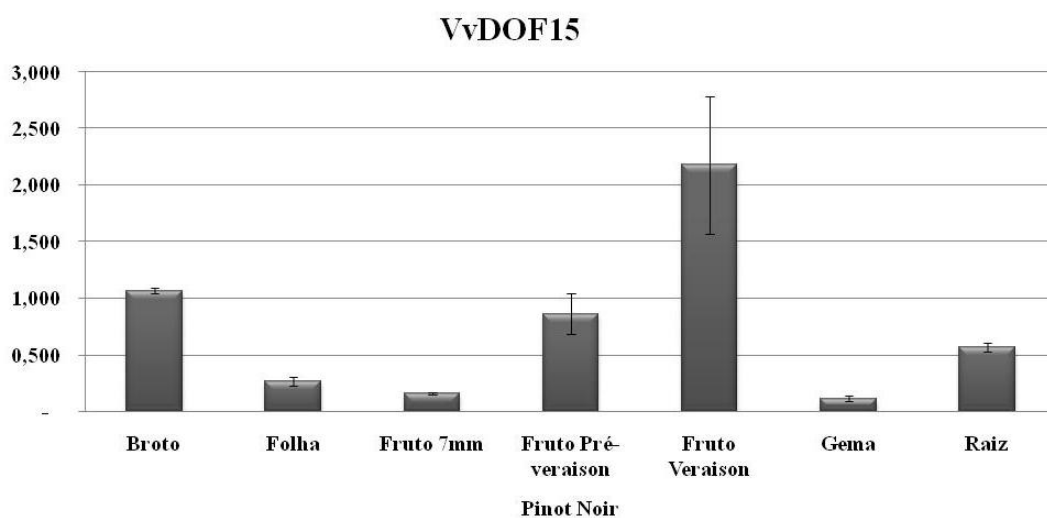
K



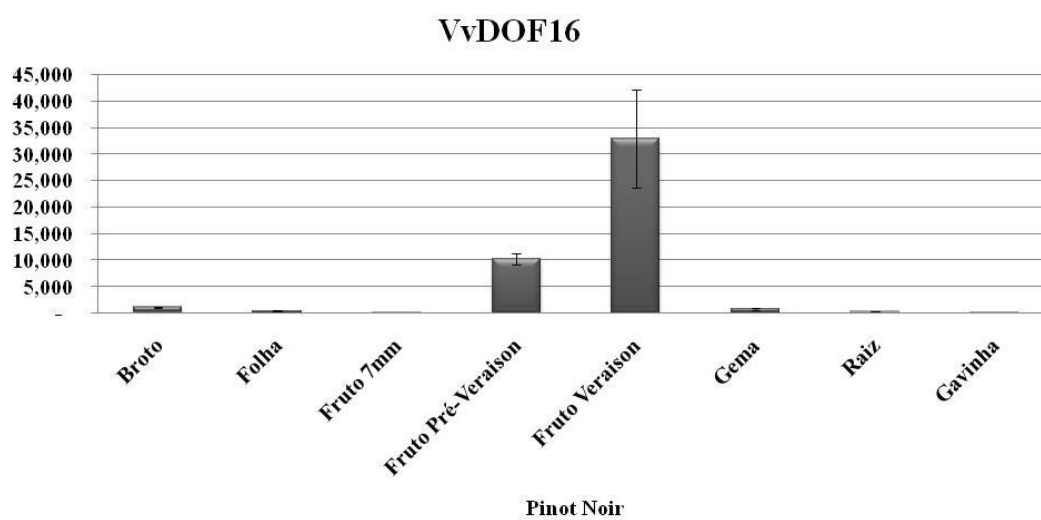
L



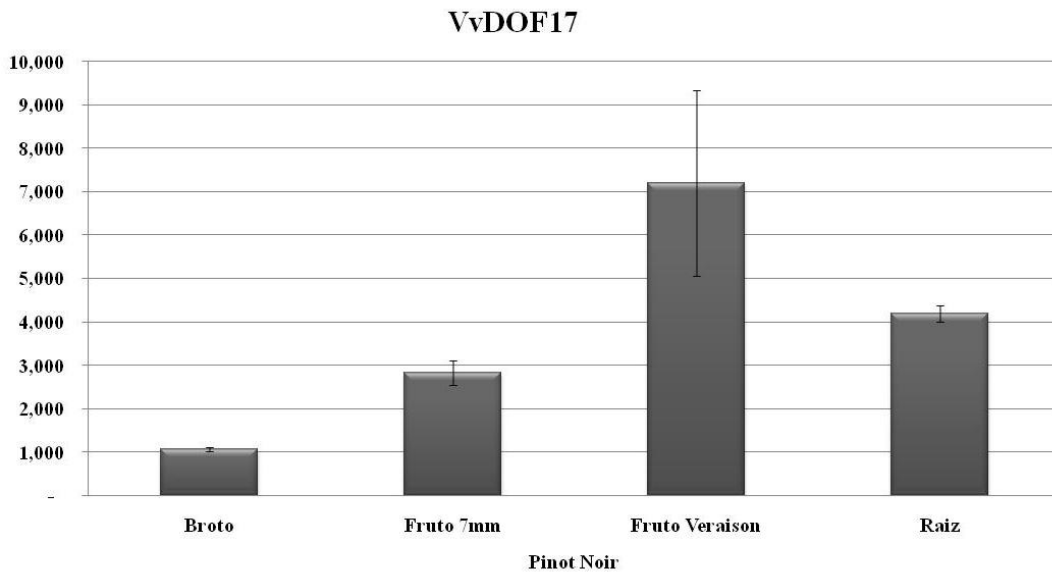
M



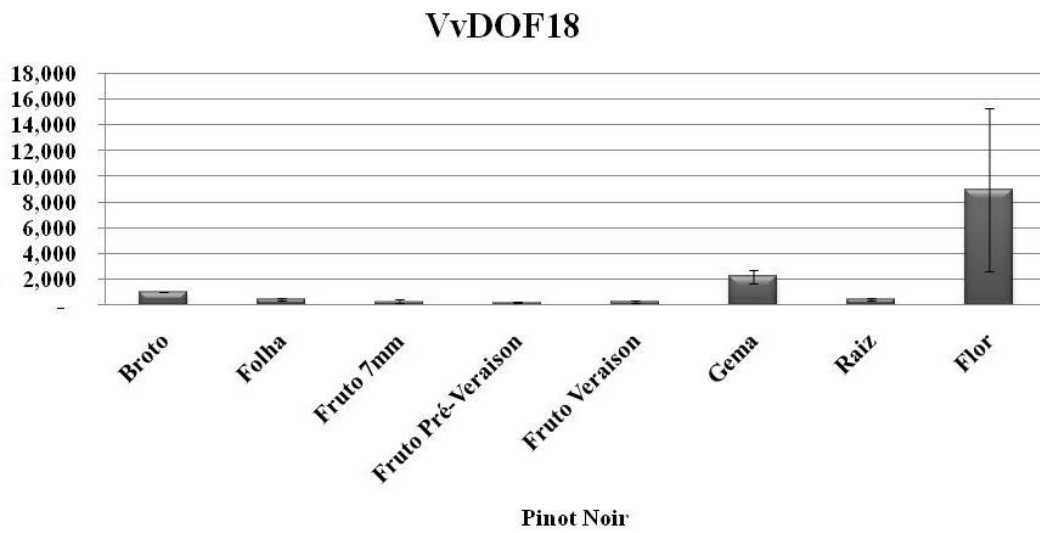
N



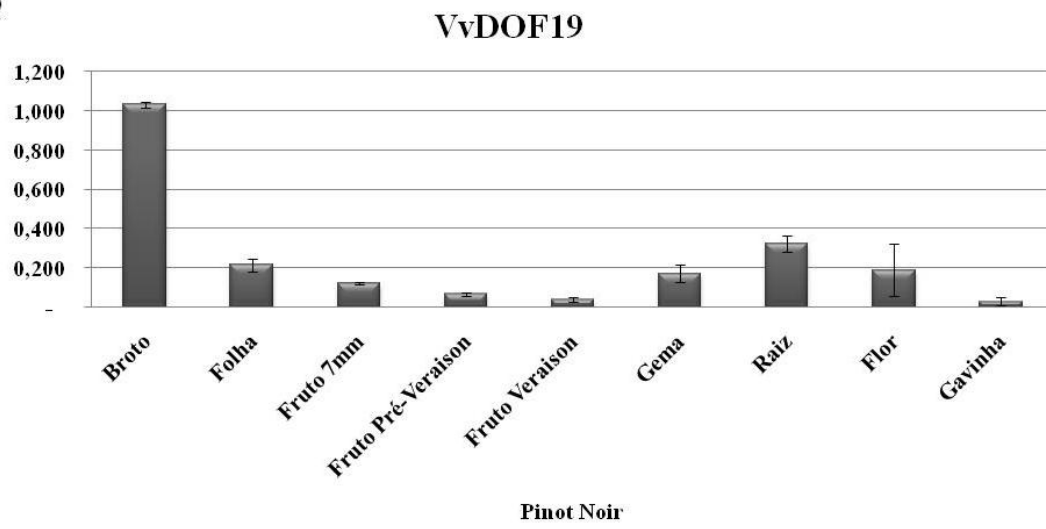
O



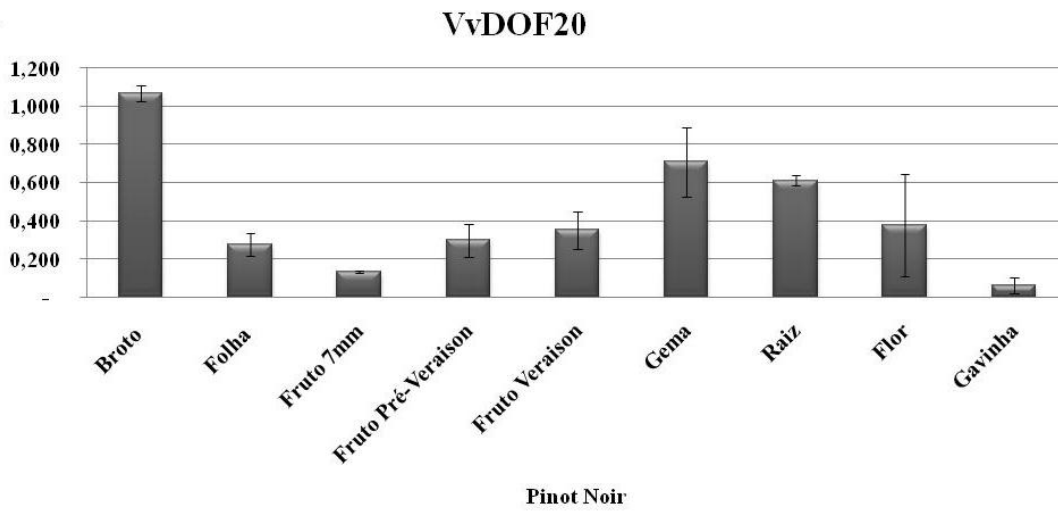
P



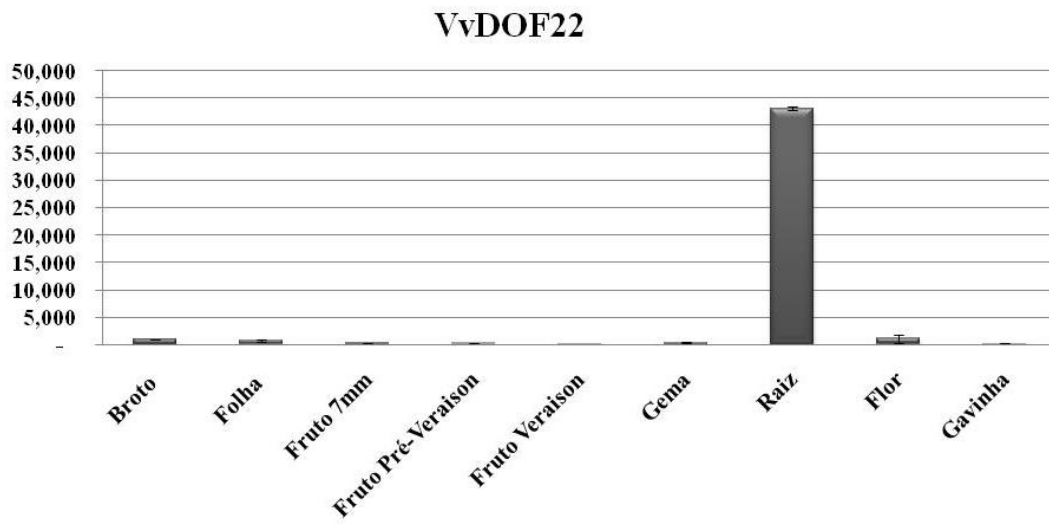
Q



R

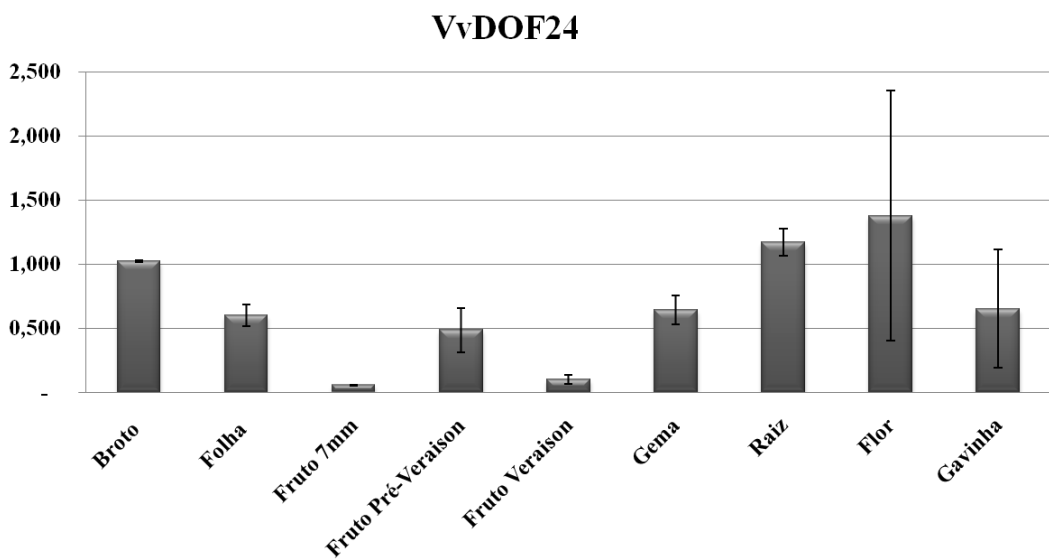


S



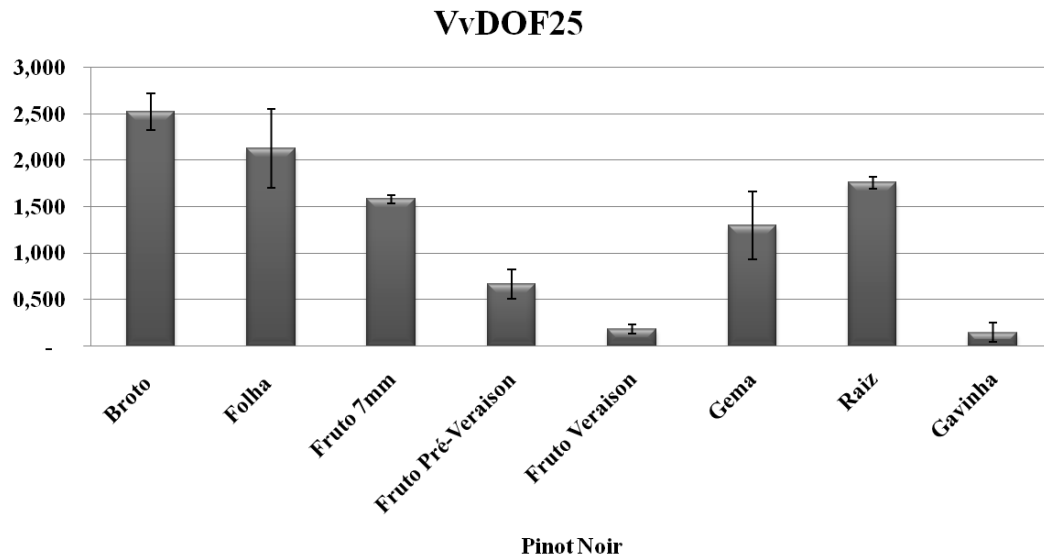
Pinot Noir

T



Pinot Noir

U



V

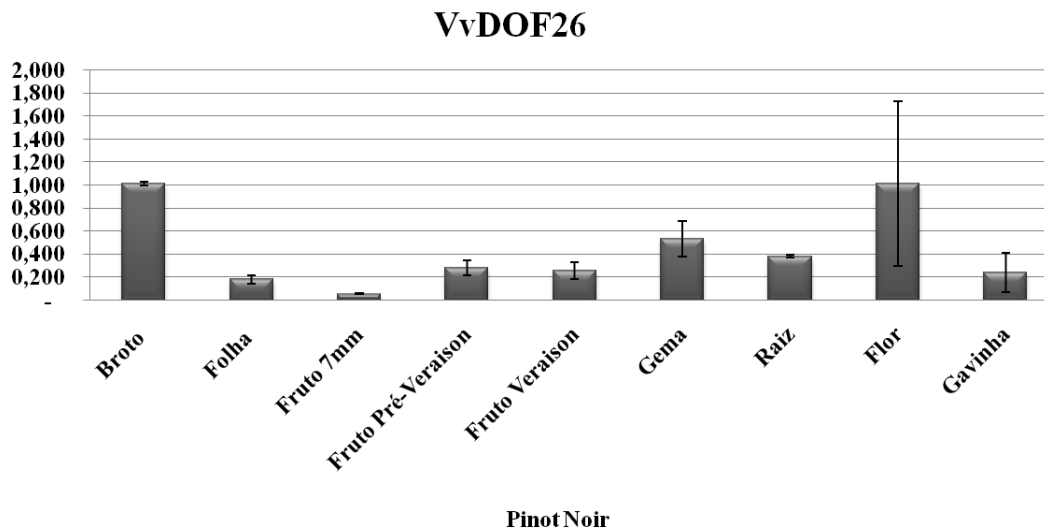


Figura 9. Expressão relativa de VvDof1(A), VvDof3(B), VvDof4(C), VvDof5(D), VvDof6(E), VvDof7(F), VvDof8(G), VvDof9(H), VvDof10(I), VvDof11(J), VvDof12(K), VvDof13(L), VvDof15(M), VvDof16(N), VvDof17(O), VvDof18(P), VvDof19(Q), VvDof20(R), VvDof22(S), VvDof24(T), VvDof25(U) e VvDof2(V) medidas por q-PCR em nove órgãos do período vegetativo e reprodutivo da videira. Broto, folha, fruto 7 mm, fruto pré-*véraison*, fruto *véraison*, gema, raiz, flor, e gavinha

são representados no eixo X e a expressão relativa ao broto no eixo Y. As expressões dos genes de referências VvGAPDH e VvTUB foram utilizadas para normalizar os valores de expressão dos genes candidatos.

CURRICULUM VITAE RESUMIDO

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Danielle Costenaro da Silva

Local e data de nascimento: Ouro, SC, Brasil. 12/11/1975

Endereço: Av. Alegrete, 510/203

Telefone: (51)33911031

E-mail: danicostenaro@gmail.com

2. FORMAÇÃO

Graduação: Curso de Ciências Biológicas (UPF, 1996-2000).

Mestrado: Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, ênfase em Melhoramento Genético, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil (2001-2003). Mapeamento de QTLs para tolerância ao frio em Arroz. Orientadora Dra. Sandra Cristina Kothe Milach.

Doutorado: Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (Centro de Biotecnologia – UFRGS, 2005-2010). Orientador Prof. Dr. Giancarlo Pasquali. Data da defesa: 03 de março de 2010.

3. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Analista Laboratorial Sênior – Laboratório Nacional Agropecuário no Rio Grande do Sul, Lanagro, RS, Brasil – Celetista formal (Atual).

Responsável Técnico – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil – Colaborador (2003).

4. PROJETOS DE PESQUISA

Projeto de Mestrado

2001/2003 – Mapeamento de QTLs para tolerância ao frio e características de importância agronômica em arroz.

Bolsista DTI – Embrapa Uva e Vinho

2004 - Mapeamento de genes de resistência da videira ao míldio e ao oídio e sua incorporação em uvas apirênicas.

Projeto de Doutorado

2005/2010 - Identificação de sequências diferencialmente expressas durante o desenvolvimento inicial do fruto em cultivares de uva de mesa sem sementes (*Vitis vinifera* L.) utilizando análise representacional diferencial (RDA).

5. PRÊMIOS E TÍTULOS

2006 - Prêmio Iniciação Científica - Menção Honrosa a Trabalho na Área de Genética, Evolução e Melhoramento de Plantas apresentado pela orientada de IC Sinara Artico (Ciências Biológicas, IB, UFRGS), Sociedade Brasileira de Genética.

2006 - Proficiência em leitura da língua francesa, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2001 - Proficiência em leitura da língua inglesa, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

6. PARTICIPAÇÃO EM CURSOS

7. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos publicados em periódicos

1. Cruz, R. P., Milach, S. C. K., Federizzi, L. C., Lima, J. C., Costenaro Da Silva, D. **Variabilidade fenotípica e molecular em genótipos de arroz com diferentes reações ao frio.** Revista Brasileira de Agrociência. (*In Press*) 2008.
2. Costenaro Da Silva, D., Cruz, R.P, Milach, S.C.K, Limberger, E. **Molecular mapping of chilling tolerance at the germination stage of Rice (*Oryza sativa* L.).** Genetics and Molecular Biology (Submitted) 2010.
3. Costenaro Da Silva, D., Henriques, J. A. P., Margis, R., Pasquali, G., Revers, L. F. **Identification and expression analysis of genes associated with the early berry development in the seedless grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar Sultanine.** Plant Cell Report. (*Submitted*) 2010.

Capítulos de livros publicados

1. Milach, S. C. K., Silva, P. R. Da, Costenaro Da Silva, D. **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal** In: NOVOS MARCADORES MOLECULARES NA ERA DO SEQUENCIAMENTO DE DNA, 2003.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

1. Costenaro Da Silva, D.; Revers, L. F.; Pasquali, G.; Henriques, J. A. P. **Perfil transcricional dos genes associados ao desenvolvimento inicial do fruto da cultivar de uva sem sementes Thompson Seedless (*Vitis vinifera* L.).** In: XII Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia, 2008, Bento Gonçalves. XII

Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia - Anais. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. v. 1. p. 1-185.

2. Costenaro Da Silva, D., Henriques, J. A. P., Pasquali, G., Revers, L. F. **Construção de bibliotecas representando genes estádio-específicos durante o desenvolvimento inicial do fruto da cultivar de uva sem semente Thomson Seedless** In: 58 Congresso Nacional de Botânica, 2007, São Paulo - SP. A Botânica no Brasil: Pesquisa, Ensino e Políticas Públicas Ambientais. , 2007.

3. Costenaro Da Silva, D., Passaia, G., Sbeghen, F. Avaliação da herança da resistência ao míldio em uma população segregante do programa de melhoramento da embrapa uva e vinho In: Mostra UNISINOS de Iniciação Científica, 2006, São Leopoldo. **Mostra UNISINOS de Iniciação Científica.** , 2006.

4. Costenaro Da Silva, D., Artico, S., Revers, L. F., Henriques, J. A. P., Pasquali, G. **Identificação de Genes Diferencialmente Expressos durante o desenvolvimento inicial do fruto em cultivares de uva sem sementes (VITIS VINIFERA L.) utilizando a análise representacional diferencial (RDA)** In: 57 Congresso Nacional de Botânica, 2006, Gramado. 57 Congresso Nacional de Botânica, 13 Encontro Estadual de Botânicos e 5 Encontro Estadual de Herbários., 2006.

5. Artico, S., Costenaro Da Silva, D., Revers, L. F., Pasquali, G., Henriques, J. A. P. Identificação de Genes Diferencialmente Expressos durante o desenvolvimento inicial do fruto em cultivares de uva sem sementes (*Vitis vinifera* L.) utilizando a análise representacional diferencial (RDA) In: 52 Congresso Brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu, 2006.

6. Costenaro Da Silva, D., Crippa, A, Revers, L. F., Pasquali, G., Henriques, J. A. P. **Identification of differential expresses genes during the initial fruit development in seedless grape berry (*Vitis vinifera* L.) using Representational Difference Analysis (RDA).** In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, Águas de Lindóia – SP, 2006.

7. Revers, L. F., Irala, P. B., Costenaro Da Silva, D., Machado, C. A. E., Lampe, V. S., Oliveira, P. R. D., Garrido, L. R. **Construção de um mapa genético de referência para o desenvolvimento de ferramentas moleculares aplicadas ao melhoramento da videira.** In: X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia e II Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura e Enologia, 2005, Bento Gonçalves.

8. Costenaro Da Silva, D., Irala, P. B., Revers, L. F., Oliveira, P. R. D., Machado, C. A. E., Garrido, L. R. **Mapeamento de genes de resistência ao Oídio e sua incorporação em uvas apirênicas.** In: 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Gramado, 2005.

9. Costenaro Da Silva, D., Milach, S. C. K., Cruz, R. P. **Correlações entre características de tolerância ao frio e características agrônômicas em arroz** In: 48 Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, 2002.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo expandido)

1. Costenaro Da Silva, D., Irala, P. B., Lampe, V. S., Revers, L. F., Camargo, U. A., Oliveira, P. R. D., Garrido, L. R., Machado, C. A. E., Wagner, C.M. **Melhoramento genético da videira na embrapa uva e vinho: utilização de marcadores microssatélites para proteção intelectual e aferição da identidade genotípica** In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, Florianópolis, 2004.
2. Costenaro Da Silva, D., Silva, P. R. Da, Milach, S. C. K., Federizzi, L. C. **Desenvolvimento de uma marcador molecular cultivar específico em aveia** In: XXIV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia, Pelotas, 2004.
3. Costenaro Da Silva, D., Milach, S. C. K., Cruz, R. P., Limberger, E. **Mapeamento de QTLs para tolerância ao frio em arroz** In: III Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado/XXV Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, Balneário Camboriú, 2003.

8. PRODUÇÃO TÉCNICA

Palestra

4. Costenaro Da Silva, D. **Identificação de Genes Diferencialmente Expressos durante o desenvolvimento inicial do fruto em cultivares de uva sem sementes (*Vitis Vinífera* L.) utilizando a análise representacional diferencial (RDA)**, 2006. (Palestra UERGS Bento Gonçalves, RS).

Orientações concluídas

1. Sinara Artico. **Construção e análise de uma biblioteca de cDNA, visando identificar genes envolvidos na síntese de alcalóides em *Psychotria brachyceras***. 2005. Iniciação científica (Biologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
2. Emerson Limberger. **Mapeamento de QTLs para tolerância ao frio em arroz**. 2003. Iniciação científica (Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.