

## Contenido

Índice de figuras .....	VI
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Estudio de <i>Vitis vinífera</i> .....	1
1.2. Generalidades del cultivar Carménère .....	1
1.3. Desarrollo reproductivo vegetal.....	2
1.4. Desarrollo frutal de la vid.....	3
1.5. Desarrollo de órganos florales y gametofitos en plantas .....	7
1.6. Características estructurales de los factores de transcripción “zinc-finger” .....	8
1.7. VvPSZ3 factor de transcripción del tipo “zinc-finger” involucrado en el desarrollo reproductivo de vides.....	10
2. HIPÓTESIS .....	13
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo general.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1. Materiales .....	14
4.1.1. Hardware.....	14
4.1.2. Material vegetal.....	14
4.1.3. Oligonucleotidos utilizados en la realización de esta memoria .....	15
4.2. Métodos .....	16
4.2.1. Predicción de estructura secundaria de los factores de transcripción AtZAT4 y VvPSZ3 .....	16
4.2.2. Modelamiento por homología de los factores de transcripción codificados.....	16
4.2.3. Clonamiento del gen vvPSZ3 .....	17
4.2.4. Generación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
4.2.5. Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	19
4.2.6. Análisis fenotípico .....	20
4.2.7. Extracción de ARN .....	21
4.2.8. Síntesis de ADNc.....	22
4.2.9. Análisis de expresión de los genes AtZAT4 y VvPSZ3 por qPCR ....	22
5. RESULTADOS .....	23

5.1.	Predicción de estructura secundaria de los factores de transcripción ..	23
5.2.	Construcción de las estructuras tridimensionales de los factores de transcripción AtZAT4 y VvPSZ3.....	24
5.3.	Clonamiento del gen VvPSZ3.....	29
5.4.	Clonamiento en el vector binario pCambia 1303 .....	31
5.6.	Genotipificación de putativas plantas complementadas de la cepa CS841944.....	35
5.7.	Análisis de la expresión de los genes VvPSZ3 y AtZAT4 en plantas transgénicas .....	38
5.8.	Análisis fenotípico de putativas plantas complementadas .....	41
6.	Discusión.....	43
6.1.	Los dominios “zinc-finger” del tipo C2H2 son conservados ZAT4 como en PSZ3.....	43
6.2.	VvPSZ3 complementaria la función de AtZAT4 en las plantas de la cepa CS841944.....	47
7.	CONCLUSIONES.....	49
8.	REFERENCIAS .....	50

## Índice de figuras

<b>FIGURA 1</b> CURVA DE DESARROLLO NORMAL DEL FRUTO DE VID EN CONJUNTO CON EL CRECIMIENTO DE LA SEMILLA DENTRO DEL MISMO, LO CUAL DEMUESTRA QUE LA COORDINACIÓN DE AMBOS EVENTOS ES CRUCIAL PARA EL CORRECTO DESARROLLO DEL FRUTO. ....	5
<b>FIGURA 2</b> EN VERDE, TASA DE POLEN ABERRANTE EN DISTINTOS CULTIVARES DE VITIS VINÍFERA EN DIFERENTES TEMPORADAS Y CULTIVARES DE VID. EN ROJO, PORCENTAJE DE “MILLERANDAJE” PRESENTADO POR LAS MISMAS VARIEDADES EN LOS MISMOS TIEMPOS, SUGIRIENDO QUE LA RELACIÓN ENTRE EL POLEN ABERRANTE Y TASA DE “MILLERANDAJE” ES DIRECTA. ....	6
<b>FIGURA 3</b> PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO “ZINC-FINGER” DURANTE EL DESARROLLO DE ANTERAS Y POLEN EN LA ESPECIE PETUNIA HYBRIDA. ....	7
<b>FIGURA 4</b> ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LOS DOMINIOS “ZINC-FINGER” C2H2 CONOCIDOS QUE CORRESPONDEN A ESTA FAMILIA. ....	9
<b>FIGURA 5</b> COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA AMINOACÍDICA DE VVPSZ3 CON SUS PUTATIVOS HOMÓLOGOS DE OTRAS ESPECIES DE PLANTAS. EL ALINEAMIENTO FUE REALIZADO CON LAS SECUENCIAS CON MAYOR IDENTIDAD PRESENTES EN PLANTAS (AL AÑO 2011). LOS RESIDUOS AMINOACIDICOS IDÉNTICOS SE MUESTRAN ENNEGRECIDOS. LOS TRES DOMINIOS “ZINC FINGER” Y LA CAJA L ENCONTRADOS USANDO INTERPROSCAN Y SMART SE ENCUENTRAN ENCERRADOS EN CUADROS. LA SEÑAL DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR (IDENTIFICADA CON NUCPRED; BRAMEIER Y COLS., 2007) SE ENCUENTRA SEÑALADA COMO NLS. LA CAJA EAR DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL FUE IDENTIFICADA POR INSPECCIÓN VISUAL, DE ACUERDO A LO DESCRITO EN LA LITERATURA. ....	11
<b>FIGURA 6</b> .- REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA PROPORCIONAL DE LA INSERCIÓN DE ADN-T DENTRO DEL GENOMA DE A. THALIANA Y DENTRO DE LA SECUENCIA PROMOTORA DE ZAT4. EL ADN-T CORRESPONDE AL VECTOR PCSA110, QUE LLEVA GEN DE RESISTENCIA A FOFINOTRICINA (BASTA; COMANDADO POR PROMOTOR 1'2'), GEN DE RESISTENCIA A AMPICILINA Y GEN MARCADOR GUS (COMANDADO POR PROMOTOR LAT52). RB Y LB, BORDE DERECHO E IZQUIERDO DEL ADN-T, RESPECTIVAMENTE. BASE 1 MARCA EL INICIO DE LA REGIÓN CODIFICANTE. ....	12
<b>FIGURA 7.-</b> ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE LOS DOMINIOS “ZINC-FINGER” DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ATZAT4 Y VVPSZ3 CON LAS SECUENCIAS CONOCIDAS DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS PERTENECIENTES A LA FAMILIA C2H2. ....	23
<b>FIGURA 8.-</b> ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA AMINOACIDICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ATZAT4 CONTRA LA BASE DE DATOS PDB, NO SE OBTUVO NINGUNA COINCIDENCIA CON UN PORCENTAJE DE IDENTIDAD MAYOR AL 40%. SE IDENTIFICAN 2 DE LOS 3 MOTIVOS “ZINC-FINGER” PREDICHOS EN TRABAJOS ANTERIORES. ....	24
<b>FIGURA 9.-</b> ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA AMINOACIDICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN VVPSZ3 CONTRA LA BASE DE DATOS PDB, NO SE OBTUVO NINGUNA COINCIDENCIA CON UN PORCENTAJE DE IDENTIDAD MAYOR AL 40%. SE IDENTIFICAN LOS 3 MOTIVOS “ZINC-FINGER” PREDICHOS EN TRABAJOS ANTERIORES. ....	25
<b>FIGURA 10.-</b> MODELO DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ATZAT4 GENERADO CON EL SOFTWARE MODELLER V9.14. ....	27
<b>FIGURA 11.-</b> MODELO DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN VVPSZ3 GENERADO CON EL SOFTWARE MODELLER V9.14. ....	27

<b>FIGURA 12.-</b> ESTRUCTURAS CORRESPONDIENTES A LOS MOTIVOS “ZINC-FINGER” (ZF1-3) DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ATZAT4 Y VVPSZ3 GENERADOS CON EL SOFTWARE MODELLER V9.14 UTILIZANDO COMO TEMPLADOS LAS 5 ESTRUCTURAS CRISTALIZADAS CON MEJOR PORCENTAJE DE IDENTIDAD, EN AZUL LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA, EN AMARILLO LOS RESIDUOS DE HISTIDINA.	28
<b>FIGURA 13.-</b> PATRÓN DE MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PRODUCTOS OBTENIDOS DE LA REACCIÓN PCR REALIZADA SOBRE ADN GENÓMICO DE FLORES DE VID, SE UTILIZÓ GENERULER 100 BP DNA LADDER (LIFETECHNOLOGIES, SM0241), LA BANDA AMPLIFICADA CORRESPONDE A APROXIMADAMENTE 1080 PARES DE BASES.	29
<b>FIGURA 14.-</b> AMPLIFICACIÓN DEL GEN VVPSZ3 DE 7 COLONIAS SELECCIONADAS POSITIVAS EN EL PARA LA INSERCIÓN DEL FRAGMENTO DE 1080 PARES DE BASES CORRESPONDIENTE AL GEN VVPSZ3, SE UTILIZÓ GENERULER 100 BP DNA LADDER (LIFETECHNOLOGIES, SM0241).	30
<b>FIGURA 15.-</b> ESQUEMA DE LA CONSTRUCCIÓN DENTRO DEL VECTOR BINARIO PCAMBIA 1303, EL GEN VVPSZ3 SE INSERTÓ ENTRE LOS SITIOS DE RESTRICCIÓN NCOI Y SPEI.	31
<b>FIGURA 16.-</b> VERIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DEL GEN VVPSZ3 EN ADN PLAMIDIAL DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS QUE CONTIENE LA CONSTRUCCIÓN FINAL PARA LA TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS THALIANA FUE CHEQUEADA POR PCR UTILIZANDO ADN PLASMIDIAL DE BACTERIAS DE E. COLI RECOMBINANTES, GENERULER 100 BP DNA LADDER (LIFETECHNOLOGIES SM0241).	32
<b>FIGURA 17.-</b> ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DE INMERSIÓN FLORAL.	33
<b>FIGURA 18.-</b> PCR DE PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE TRANSFORMADAS CON EL GEN VVPSZ3, COMO BLANCO SE UTILIZÓ EL MIX DE LA REACCIÓN DE PCR SIN ADN TEMPLADO, ADN GENÓMICO DE PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE (WT) COMO CONTROL POSITIVO SE UTILIZÓ ADN PLASMIDIAL DE LAS BACTERIAS RECOMBINANTES Y ADN GENÓMICO DE 8 LINEAS DE PLANTAS TRANSFORMADAS, SE UTILIZÓ EL MARCADOR DE PESO MOLECULAR GENERULER 1 KB DNA LADDER (LIFE TECHNOLOGIES SM0312).	34
<b>FIGURA 19.-</b> PCR DE PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE TRANSFORMADAS CON EL GEN VVPSZ3, COMO BLANCO SE UTILIZÓ EL MIX DE LA REACCIÓN DE PCR SIN ADN TEMPLADO, ADN GENÓMICO DE PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE (WT) COMO CONTROL POSITIVO SE UTILIZÓ ADN PLASMIDIAL DE LAS BACTERIAS RECOMBINANTES Y ADN GENÓMICO DE 8 LINEAS DE PLANTAS TRANSFORMADAS, SE UTILIZÓ EL MARCADOR DE PESO MOLECULAR GENERULER 1 KB DNA LADDER (LIFE TECHNOLOGIES SM0312).	34
<b>FIGURA 20.-</b> ESQUEMA DE LA INSERCIÓN DE ADN-T QUE INTERRUMPE EL PROMOTOR DEL GEN ATZAT4, TAMBIÉN SE MUESTRA EL DISEÑO EXPERIMENTAL PARA DETECTAR LA PRESENCIA DEL INSERTO, INSERTOFW, PARTIDOR QUE SE UNE A UNA REGIÓN INTERNA DEL ADN-T, PROMRV, PARTIDOR QUE SE APAREA CON UNA REGIÓN RIO ARRIBA DEL PROMOTOR DEL GEN, MIENTRAS QUE PROMFW SE APAREA CON UNA REGIÓN INTERNA DEL PROMOTOR.	35
<b>FIGURA 21.-</b> PATRÓN DE MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA DE UN FRAGMENTO DE LA INSERCIÓN DE ADN-T DE 516 PARES DE BASES, COMO BLANCO SE UTILIZÓ EL MIX DE LA REACCIÓN DE PCR SIN ADN COMO TEMPLADO, ADN GENÓMICO DE PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE COMO CONTROL NEGATIVO, Y COMO CONTROL POSITIVO PLANTAS DE LA CEPA ZAT4+/- Y 8 LINEAS DE PLANTAS TRANSFORMADAS, LO QUE COMPRUEBA QUE LAS PLANTAS PERTENECEN A LA CEPA CS812944, SE UTILIZÓ GENERULER 100 BP DNA LADDER (LIFETECHNOLOGIES).	36
<b>FIGURA 22.-</b> PATRÓN DE MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA DE UN FRAGMENTO DEL PROMOTOR DEL GEN ATZAT4 DE 1330 PARES DE BASES, COMO BLANCO SE UTILIZÓ EL MIX DE LA REACCIÓN DE PCR SIN ADN COMO TEMPLADO, ADN	

GENÓMICO DE PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE COMO CONTROL, Y COMO CONTROL POSITIVO ADN GENÓMICO DE PLANTAS DE LA CEPA ZAT4+/- Y 8 LÍNEAS DE PLANTAS TRANSFORMADAS, LO QUE SUGIERE QUE 7 DE LAS 8 LÍNEAS ANALIZADAS NO AMPLIFICARON EL PROMOTOR DEL GEN, POR LO QUE SE SUGIERE QUE ESTAS SON PLANTAS HOMOCIGOTAS PARA LA INSERCIÓN DE ADN-T, SE UTILIZÓ GENERULER 100 KB DNA LADDER (LIFETECHNOLOGIES)..... 37

**FIGURA 23.-** EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN ATZAT4 EN PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE (WT), PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE CON EL GEN VVPSZ3 (WT::VVPSZ3), ADN GENÓMICO DE PLANTAS HETEROCIGOTAS (ZAT4+/-) Y PLANTAS DE LA LÍNEA CS149922 CON EL GEN VVPSZ3 (ZAT4-/-::VVPSZ3) MOSTRANDO QUE, TANTO EN PLANTAS WT COMO EN LAS LÍNEAS ANALIZADAS DE WT::VVPSZ3 LA EXPRESIÓN DEL GEN ATZAT4 ES SIMILAR MIENTRAS QUE EN PLANTAS HETEROCIGOTAS EXISTE UNA DISMINUCIÓN CONSIDERABLE DE LA EXPRESIÓN DE ESTE Y EN PLANTAS ZAT4-/-::VVPSZ3 LA EXPRESIÓN CAE UN 70% RESPECTO A LA REGISTRADA EN PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE..... 39

**FIGURA 24.-** EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN VVPSZ3 EN PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE (WT), PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE CON EL GEN VVPSZ3 (WT::VVPSZ3), PLANTAS HETEROCIGOTAS (ZAT4+/-) Y PLANTAS DE LA LÍNEA CS149922 CON EL GEN VVPSZ3 (ZAT4-/-::VVPSZ3) MOSTRANDO QUE, TANTO EN PLANTAS WT COMO EN LAS LÍNEAS ANALIZADAS DE ZAT4+/- LA EXPRESIÓN DEL GEN VVPSZ3 ES CERO, YA QUE ESTAS PLANTAS NO CONTIENEN EL GEN FUNCIONANDO COMO CONTROLES NEGATIVOS, MIENTRAS QUE EN PLANTAS TRANSFORMADAS CON EL GEN PARA LA CEPA ZAT4-/-::VVPSZ3 ES SIMILAR LO QUE MUESTRA QUE LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN ES EFECTIVA EN AMBAS LÍNEAS..... 40

**FIGURA 25.-** NUMERO DE SEMILLAS POR SILICUA EN PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE (WT), LA CEPA CS841944 (ZAT4+/-), PLANTAS DE LA CEPA CS841944 CON EL GEN VVPSZ3 (ZAT4::VVPSZ3) Y PLANTAS DEL TIPO SILVESTRE TRANSFORMADAS CON EL GEN VVPSZ3 (WT::VVPSZ3), DONDE SE MUESTRA QUE EL FENOTIPO PERDIDO EN LA CEPA CS841944(ZAT4+/-) FUE RECUPERADO GRACIAS A LA TRANSFORMACIÓN. .... 42

**FIGURA 26.-** DIAGRAMA DE DEL MOTIVO “ZINC-FINGER” DE ZIF268. LAS CADENAS LATERALES DE LAS HISTIDINAS Y CISTEÍNAS CONSERVADAS, LOS CUALES ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA COORDINACIÓN DEL ZINC..... 46

## Índice de tablas

<b>TABLA 1.- CARACTERÍSTICAS DEL COMPUTADOR UTILIZADO EN LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO.....</b>	<b>14</b>
<b>TABLA 2.- PARTIDORES CEBADORES PARA LAS REACCIONES DE PCR UTILIZADAS EN EL DESARROLLO DEL TRABAJO DE TESIS. ....</b>	<b>15</b>