
**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GENES QUE
CODIFICAN PARA PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA RED REGULATORIA DEL
DESARROLLO FLORAL Y FRUTAL EN *Vitis vinifera* Cv. CARMÉNÈRE.****SEBASTIÁN ALEJANDRO GONZÁLEZ DÍAZ
DOCTORADO EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL****RESUMEN**

Vitis vinifera cv. Carménère ha sido caracterizada como una variedad con alta tendencia al desarrollo de frutos partenocárpicos, lo que redundaría en la producción de bayas semilladas y bayas no semilladas dentro de un mismo racimo. Las causas de este fenómeno no están bien esclarecidas, aun cuando ha sido asociado a problemas en la capacidad germinativa del polen otorgando al proceso de desarrollo floral una relevancia particular en la manifestación de este problema. Como primera aproximación a la caracterización de los eventos genético-moleculares involucrados en tal fenómeno, los perfiles de expresión de aproximadamente 4.800 genes fueron analizados tanto en bayas semilladas como no semilladas. El análisis comparativo de los perfiles de expresión entre ambos tipos de bayas, mostró que un número importante de genes diferencialmente expresados codifican para proteínas que no han sido caracterizadas previamente en vid. Entre estos genes, en el desarrollo de este trabajo se ha escogido a aquellos representados por los ESTs VVCCGC3015D09.b y VVCCGS2117F10.b tanto por su alta tasa de represión en bayas no semilladas como por el hecho que ellos codificarían proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica. Los genes respectivos fueron aislados y caracterizados estructural y funcionalmente. Tal análisis ha permitido identificar a los genes denominados *VvPSZ3* (representado por el EST VVCCGC3015D09.b), *VvFSK* y *VvFTK*, (representados por el EST VVCCGS2117F10.b), los que codifican para proteínas con características estructurales propias de un factor de transcripción del tipo *zinc finger* (*VvPSZ3*) y dos putativos receptores con función quinasa (*VvFSK* y *VvFTK*). Por tanto, el objetivo de esta tesis fue caracterizar estructural y funcionalmente estos genes y evaluar su patrón de expresión durante el desarrollo floral/frutal de *V. vinifera*. *VvPSZ3* es homólogo al gen *ZAT4* de *A. thaliana*, el cual codifica para una proteína esencial para el desarrollo en esta especie. Concordante con su putativa función como factor de transcripción, el producto de ambos genes se localiza en el núcleo celular. *VvPSZ3* se expresa principalmente en el polen en

flores cerradas y en la semilla de bayas al estadio de envero. El gen tiene una expresión mayor en el cultivar Cabernet Sauvignon que en Carménère, siendo el primero un cultivar que no tiene tendencia al millerandaje. Además, un análisis detallado de la expresión del gen en Caménère sugiere su participación en el desarrollo reproductivo de *Vitis vinifera*, estando esta expresión relacionada a la presencia en la región promotora del gen tanto de elementos regulatorios en *cis* para factores de transcripción que regulan el desarrollo floral como elementos asociados a la expresión en polen y semillas. Adicionalmente, la expresión de este gen parece ser inducida por ABA y ácido salicílico. Si *VvPSZ3* y *ZAT4* corresponden a genes ortólogos debe aún ser determinado. Ello permitiría especular sobre el rol de *VvPSZ3* en el desarrollo de la vid, toda vez que líneas de Arabidopsis, homocigotas para una mutación por inserción en el gen *ZAT4* no son viables. Por otra parte, los genes *VvFSK* y *VvFTK* poseen homología con *ScORK17*, gen que codifica para un receptor quinasa asociado al desarrollo de óvulos en *Solanum chacoense*, y al gen *At3g03770* de función desconocida en *A. thaliana*. Ambos genes se expresan en flores de vides, pero mientras *VvFSK* es expresado fuertemente en semillas de bayas al estadio de pre-envero, *VvFTK* se expresa en zarcillos. En ambos casos su actividad transcripcional es inducida por sacarosa y por ABA. El análisis *in silico* de la región promotora de ambos genes reveló la presencia de secuencias regulatorias asociadas tanto a la expresión en floema así como elementos de respuesta a azúcares. La función de estos genes en el desarrollo de la vid aún no está establecida. Como primera aproximación para determinar su papel, una línea de *A. thaliana* homocigota para una inserción de T-DNA en el gen homólogo *At3g03770* no genera un fenotipo evidentemente distinto al de plantas tipo silvestre.

ABSTRACT

Vitis vinifera cv. Carménère has been characterized as a variety with high tendency to develop parthenocarpic fruits yielding seeded and seedless berries in the same cluster. Even though this phenomenon has been associated to deficiencies in pollen germination capability, thus giving to flower development special relevance to the manifestation of this problem, the real origin of this condition has not been elucidated. As a first approach to the study of the molecular/genetic events involved in this problem, expression profiles of approximately 4,800 genes were analyzed in both, seeded and seedless berries. Comparative transcriptomic analysis shows that several differentially expressed genes codes for non characterized protein in grapevine. Among these genes, ESTs VVCCGC3015D09.b and VVCCGS2117F10.b were selected for further analysis due to their high repression ratio in seedless berries and the fact that they codify for proteins putatively involved in gene expression regulation.

These genes were isolated and characterized at the structural level. Such analysis allowed the identification of the *VvPSZ3* (represented by the EST VVCCGC3015D09.b), *VvFSK* and *VvFTK* (represented by the EST VVCCGS2117F10.b) genes, codifying for a protein structurally similar to a “zinc finger” transcription factor (*VvPSZ3*) and two putative receptor like-kinase proteins (*VvFTK* and *VvFSK*). The aim of this thesis was to characterize structurally and functionally these three genes and evaluate their expression pattern through the floral/fruit development of *V. vinifera*. *VvPSZ3* gene is homologous to *ZAT4* from *A. thaliana*, which encodes for an essential protein for development in this specie. Agreeing with their expected role as transcription factor, the respective encoded proteins localizes to the cell nucleus. *VvPSZ3* is mainly expressed in pollen at anthesis and seeds of berries at the pre-veraison stage. The expression of this gene is higher in Cabernet Sauvignon than in Carmenere, being the first a cultivar with low tendency to millerandaje. In addition, a more detailed analysis of gene expression in Caménère suggest a role for this gene in grapevine reproductive development and correlates with the presence in its promoter region of *cis* regulatory elements recognized by transcription factors involved in regulation of flower development, as well as elements associated to expression in pollen and seeds. Additionally, *VvPSZ3* seems to be induced by ABA and salicylic acid.

If *VvPSZ3* and *ZAT4* are orthologous genes remain to be demonstrated. Since *Arabidopsis* lines homozygous for a T-DNA insertion in the *ZAT4* gene are not viable, a similar function for *VvPSZ3* gene in grapevine development could be expected. On the other hand, *VvFSK* and *VvFTK* are homologous to *ScORK17*, a gene coding for a receptor kinase involved in the regulation of ovule development in *Solanum chacoense*, and to *At3g03770* a gene of unknown function in *A. thaliana*. Although both grapevine genes are expressed in flowers, *VvFSK* is strongly expressed in seeds of berries at pre-veraison stage, while *VvFTK* is actively transcribed in tendrils; nevertheless both genes are induced by sucrose and ABA. The *in silico* analysis of their promoter regions revealed the presence of *cis* regulatory sequences associated to response to sucrose induction as well as to phloem-specific expression. The function of these genes in grapevine development needs to be established. As a first approach to assess such role, the phenotype of the *Arabidopsis thaliana* line homozygous for T-DNA insertion in the homologous gene *At3g03770* was analyzed. However, no evident differences were found between both lines when compared with *Arabidopsis* wild type.