

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIV
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Desarrollo reproductivo de la vid.	2
1.1.1 Desarrollo de la inflorescencia.	2
1.1.2 Desarrollo de antera y polen.....	7
1.1.3 Desarrollo del fruto.....	10
1.2 Mecanismos moleculares implicados en desarrollo de antera y polen.	12
1.2.1 Regulación del desarrollo de antera y polen en <i>A. thaliana</i>	12
1.2.2 Factores de transcripción del tipo zinc-finger.	14
1.2.3 VviPSZ3: factor de transcripción del tipo C ₂ H ₂ zinc-finger en <i>Vitis vinifera</i>	18
II HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	20
III OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo general.	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
IV MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.	22
4.2 Búsqueda de genes implicados en desarrollo floral en vides.	23

4.3 Selección de plantas transgénicas y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
4.4 Análisis de la expresión relativa.....	26
4.4.1 Extracción de ARN.....	26
4.4.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc).	27
4.4.3 Análisis de la expresión génica.	27
4.5 Análisis de la temporalidad del desarrollo de anteras y polen en la vid.....	28
4.5.1 Caracterización fenológica.	28
4.5.2 Microscopía.	28
4.6 Caracterización fenotípica del mutante <i>Atzat4</i> (+/-).....	29
4.6.1 Viabilidad del polen.	29
4.6.2 Germinación y elongación del tubo polínico <i>in vitro</i>	30
4.6.3 Cuantificación del número de semillas por silicuas y tamaño de la silicua.	30
4.6.4 Viabilidad y germinación de semillas.	31
4.6.5 Cuantificación de las hojas por roseta.	31
4.7 Análisis de la actividad transcripcional de los promotores de <i>VviPSZ3</i> y <i>AtZAT4</i>	32
4.8 RNA-seq y análisis bioinformático.	32
4.9 Análisis estadístico.	34
V RESULTADOS	35
5. 1 El desarrollo del polen se posiciona entre los estadios 13 y 15 del sistema E-L.	36
5.1.1 Fenología del desarrollo de la inflorescencia en <i>V. vinifera</i> cv. Carménère.	36
5.1.2 Análisis de la expresión de genes involucrados en el desarrollo floral, de la antera y del grano de polen en <i>V. vinifera</i> cv. Carménère.....	39
5.2 <i>Atzat4</i> (+/-) muestra defectos en la línea germinal masculina y en la fertilidad.	45
5.2.1 Viabilidad y germinación del grano de polen.....	45
5.2.2 Cuantificación de semillas por silicua y tamaño de la silicua.	47

5.2.3 Viabilidad y germinación de las semillas.....	48
5.2.4 Número de hojas por roseta.....	50
5.3 Plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con la construcción prom35S::VviPSZ3/Atzat4 mostraron corrección del fenotipo del mutante Atzat4 (+/-).	50
5.3.1 Germinación y elongación del grano de polen.....	50
5.3.2 Número de semillas por silicuas y tamaño de la silicua en plantas transformadas con construcción prom35S::VviPSZ3/Atzat4.....	52
5.3.3 Viabilidad y germinación de las semillas en plantas transformadas con la construcción prom35S::VviPSZ3/Atzat4.....	53
5.3.4 Los promotores de VviPSZ3 y AtZAT4 mostraron actividad temporal y espacial similar en plantas de tabaco transformadas.....	54
5.4 Genes involucrados en el desarrollo reproductivo de <i>A. thaliana</i> se expresan diferencialmente en flores.....	55
5.4.1 Análisis de <i>Gene Ontology</i> de genes diferencialmente expresados en el RNA-seq.....	55
5.4.2 Genes involucrados en el desarrollo reproductivo de <i>A. thaliana</i> son putativos blancos de VviPSZ3 y AtZAT4.....	60
VI DISCUSIÓN	66
6. 1 Temporalidad del desarrollo floral en <i>V. vinifera</i> cv. Carménère.....	67
6.2 Genes descritos en la red regulatoria del desarrollo floral y del grano de polen, en <i>Arabidopsis</i> , se expresan diferencialmente en la vid cv. Carménère.....	69
6.3 La expresión de VviPSZ3 es dinámica durante el desarrollo de la inflorescencia en la vid cv. Carménère.....	75
6.4 Atzat4 (+/-) muestra defectos en la línea germinal masculina.....	76
6.5 Atzat4 (+/-) muestra defectos en la fertilidad.....	78
6.6 VviPSZ3 de <i>V. vinifera</i> cv. Carménère corrige el fenotipo del mutante Atzat4 de <i>A. thaliana</i>	80

6.7 Los promotores de VviPSZ3 y AtZAT4 muestran similar actividad durante el desarrollo floral.	82
6.8 Genes asociados al desarrollo de polen y semillas en <i>A. thaliana</i> muestran patrones de expresión diferencial en el mutante <i>Atzat4</i> (+/-).	83
6.9 VviPSZ3 regula la expresión de genes asociados al desarrollo de polen y semillas.....	86
VII CONCLUSIONES	90
VIII BIBLIOGRAFÍA.....	93
IX MATERIAL SUPLEMENTARIO	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la red regulatoria genética del tiempo de floración en <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
Figura 2. Modelo ABCE del desarrollo floral en <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
Figura 3. Diagrama esquemático del desarrollo del polen en <i>Arabidopsis</i>	9
Figura 4. Desarrollo de la inflorescencia en <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère.	37
Figura 5. Desarrollo del grano de polen en <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère.	38
Figura 6. Perfiles de expresión de genes que codifican para factores de transcripción del tipo MADS-box en <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère.	40
Figura 7. Perfiles de expresión de genes involucrados en el desarrollo de la antera en <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère.	41
Figura 8. Perfiles de expresión de genes involucrados en el desarrollo del polen en <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère.....	43
Figura 9. Perfiles de expresión de genes involucrados en la microgametogénesis del polen en <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère.	44
Figura 10. Perfil de expresión del gen <i>VviPSZ3</i>	45
Figura 11. Línea germinal masculina del mutante <i>Atzat4</i> (+/-) comparada con el ecotipo Col-0 (WT) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
Figura 12. Fertilidad del mutante <i>Atzat4</i> (+/-) comparado con el ecotipo Col-0 (WT) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
Figura 13. Viabilidad y germinación de semillas del mutante <i>Atzat4</i> (+/-) de <i>Arabidopsis thaliana</i> en comparación al ecotipo Col-0 (WT).....	49
Figura 14. Cuantificación de las hojas por roseta del mutante <i>Atzat4</i> (+/-) de <i>Arabidopsis thaliana</i> en comparación al ecotipo Col-0 (WT).....	50
Figura 15. Línea germinal masculina de plantas transgénicas <i>prom35S::VviPSZ3/Atzat4</i> comparada con el ecotipo Col-0 (WT) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
Figura 16. Fertilidad de plantas transgénicas <i>prom35S::VviPSZ3/Atzat4</i> comparada con el ecotipo Col-0 (WT) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
Figura 17. Viabilidad y germinación de semillas de plantas transgénicas <i>prom35S::VviPSZ3/Atzat4</i> comparada con el ecotipo Col-0 (WT) de <i>Arabidopsis thaliana</i> . ..	53

Figura 18. Actividad GUS en plantas transgénicas de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi con las construcciones promVviPSZ3:: <i>GUS</i> y promAtZAT4:: <i>GUS</i>	55
Figura 19. Análisis de ontología genética (GO) de genes diferencialmente expresados en flores de <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
Figura 20. Patrón de expresión diferencial en tres genotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	64
Figura 21. Modelo propuesto para la posición de <i>VviPSZ3</i> en el desarrollo del polen en <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère.	89
Figura S1. <i>Heat map</i> de agrupación jerárquica (<i>Hierarchical clustering heat map</i>).	111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de partidores utilizados en esta tesis.....	23
Tabla 2. Fenología de la inflorescencia en <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère..	36
Tabla S1. Resumen de estadísticas del procesamiento de filtrado de calidad y mapeo de las lecturas obtenidas por RNA-seq.....	111
Tabla S2. Genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> expresados diferencialmente en la comparación WT_35S::VviPSZ3/zat4.....	112
Tabla S3. Genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> expresados diferencialmente en la comparación WT_Atzat4 (+/-).	115
Tabla S4. Genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> expresados diferencialmente en la comparación Atzat4 (+/-) _35S::VviPSZ3/zat4.	118