



UNIVERSIDAD DE TALCA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EVALUACIÓN DEL ROL FUNCIONAL DEL GEN *VviPSZ3* EN EL
DESARROLLO REPRODUCTIVO DE *Vitis vinifera* L. cv. Carménère.
ANÁLISIS MEDIANTE COMPLEMENTACIÓN DEL MUTANTE *zat4*
DE *Arabidopsis thaliana***

ANA CAROLINA PUENTES ROMERO

Doctora en Ciencias Mención Ingeniería Genética Vegetal

Director: Dr. Enrique González Villanueva

Codirector: Dr. Simón Ruiz Lara

Talca, marzo de 2021

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

Candidata a Doctora: Ana Carolina Puentes Romero

Fecha de inicio de Tesis: Noviembre de 2016

Fecha de término de Tesis: Noviembre de 2020

Director de Tesis: Dr. Enrique González Villanueva

Codirector de Tesis: Dr. Simón Ruiz Lara

Instituto de Ciencias Biológicas

Universidad de Talca

2 Norte 685, Casilla 747, Talca

sruiz@utalca.cl

Integrantes de la Comisión de Evaluación:

Dr. Rubén Almada

Genómica Funcional

Centro de Estudios Avanzados en Fruticultura (CEAF)

Dr. Fernando Guerra

Instituto de Ciencias Biológicas

Universidad de Talca

Dr. Michael Handford

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

AGRADECIMIENTOS

A ANID por otorgarme la beca de doctorado nacional y el beneficio de gastos operacionales para la realización de mi tesis.

Al Instituto de Ciencias biológicas de la Universidad de Talca.

Al Dr. Enrique González Villanueva (Q.E.P.D.) por apoyarme y confiar en mi investigación desde el primer día, por orientar y dirigir mi tesis doctoral. Del mismo modo al Dr. Simón Ruiz Lara por ser mi codirector de tesis, por sus consejos y apoyo constante durante el doctorado. A ambos profesores mi gratitud por su buena disposición y permitirme formar parte del laboratorio de Genómica Funcional.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Alex San Martín, Celia Delgado, Roberto Mateluna, Jorge Pérez, Ricardo Pérez y Claudia Gómez por sus consejos, orientación y apoyo durante el doctorado, también por la compañía, risas y cantos.

A mis amigos Manuel Araya, Gastón Bravo, Mariana Díaz, Patricia Vera y Jacqueline Navarrete por sus consejos y apoyo incondicional.

A todos los integrantes del laboratorio de Genómica Funcional, especialmente a Mónica Yáñez por su buena disposición y apoyo durante el doctorado.

A mis padres Ana María y Eduardo, a mis hermanos Oscar y Daniel, por su apoyo y confiar siempre en mí.

Dedico esta tesis a la memoria de mi abuelo Oscar.

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

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ARN	Ácido Ribonucleico
bHLH	Basic helix-loop-helix
°C	Grados Celsius
C ₂ H ₂ -ZF	C ₂ H ₂ zinc-finger
C ₂ H ₂ -ZFP	Proteína C ₂ H ₂ zinc finger
cm	centímetros
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia 0
cv.	cultivar
dNTPs	Desoxinucleósidos trifosfato
DNAsa	Desoxirribonucleasa
EAR	ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E-L	Eichhorn and Lorenz
GAs	Giberelinas
GEA	Genes de la especificación de las anteras
GDP	Genes del desarrollo y maduración del polen
GDS	Genes del desarrollo del embrión y las semillas
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPF	Genes del proceso de doble fecundación.
GPM	Genes de la formación del polen maduro.
GUS	β-glucuronidasa
h	hora
IM	Meristema de la inflorescencia
log ₂ FC	<i>log₂ fold change</i>
LRR-RLK	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinases
min	minutos
mm	milímetro
mM	milimolar
mL	mililitros
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanogramos
pb	pares de bases
PP	Células parietales primarias

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PMC	Células Madres del Polen
PMI	Mitosis del Polen I
PMII	Mitosis del Polen II
prom	promotor
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
s	segundos
SAM	Meristema apical caulinar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SE	Error estándar
SPC	Células Parietales Secundarias
TAIR	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource
TZ	cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
μL	microlitro
μM	micromolar
ZFP	Proteína zinc finger

RESUMEN

Vitis vinifera L. es un importante cultivo frutal a nivel mundial. Por esta razón, es esencial comprender el desarrollo reproductivo de esta especie. Sin embargo, en la actualidad se tiene escaso conocimiento sobre su control genético. Algunos cultivares de vides, como Carménère, presentan alta incidencia en el desarrollo de frutos partenocárpicos, los cuales se forman sin el proceso de doble fecundación, por consiguiente, no presentan semillas, permaneciendo pequeños y verdes hasta la maduración. El polen desempeña un papel fundamental en la fertilidad de la planta, a través de la entrega de los gametos masculinos al saco embrionario, para que ocurra la doble fecundación. En especies modelos, se han descrito factores de transcripción del tipo C_2H_2 zinc-finger (C_2H_2 -ZF) involucrados en diferentes estadios del desarrollo y maduración del polen. En la vid, *VviPSZ3* es un C_2H_2 -ZF que estaría involucrado en el desarrollo del polen y semillas. En este trabajo, se posicionó a *VviPSZ3* en la red regulatoria del desarrollo de polen y semillas. Primero, se determinó el patrón temporal del desarrollo floral y del polen en la vid, posicionando el desarrollo del polen entre los estadios 13 y 15 del sistema E-L. Con estos antecedentes, se determinó que *VviPSZ3* se expresa tardíamente en el desarrollo de anteras y polen. Luego, se expresó *VviPSZ3* en el genotipo mutante de *Atzat4*, un putativo ortólogo en *Arabidopsis thaliana*. Se caracterizó fenotípicamente el mutante *Atzat4* (+/-), como putativo ortólogo de *VviPSZ3*, observándose defectos en la línea germinal masculina, mostrando defectos en la germinación y elongación del tubo polínico. Además, *Atzat4* (+/-) presentó una reducida fertilidad, con un menor número de semillas por silicua, las cuales, además, mostraron una reducida viabilidad y germinación; de igual manera mostró un tamaño de silicua menor al compararse con el WT. La expresión de *VviPSZ3* en *Atzat4* restableció el fenotipo silvestre, mostrando corrección de los defectos en el desarrollo del polen y semillas, previamente caracterizados en el mutante, sugiriendo que ambos factores de transcripción son ortólogos. Finalmente, se identificaron putativos genes blanco de *VviPSZ3*, en plantas transgénicas de *A. thaliana*, los cuales estarían involucrados en procesos del desarrollo y maduración del grano de polen, fundamentalmente, durante la formación de la pared y la cubierta del polen; además, durante el proceso de polinización y doble fecundación. Asimismo, se identificaron genes blancos de *VviPSZ3*, que participan en el desarrollo del embrión y las semillas. Con estos resultados, se puede concluir que *VviPSZ3* estaría involucrado

en procesos reproductivos de *V. vinifera* cv. Carménère, asociado al desarrollo del polen y semillas.

ABSTRACT

Vitis vinifera L. is an important fruit crop worldwide. For this reason, it is essential to understand its reproductive development. However, currently there is little knowledge about its genetic control. Some grapevine cultivars, such as cv. Carménère, have a high incidence in the development of parthenocarpic fruits, which forms without the double fertilization process, and consequently, do not present seeds, remaining small and green until maturation. Pollen plays a fundamental role in plant fertility, through the delivery of male gametes to the embryo sac, to double fertilization occurs. In model species, C₂H₂-type zinc-finger transcription factors (C₂H₂-ZF) have been involved in different pollen development and maturation stages. In grapevine, VviPSZ3 is a C₂H₂-ZF that would be involved in pollen and seeds development. In this work, VviPSZ3 was positioned in the pollen and seed development regulatory network. First, the flower and pollen development timing on the grapevine, was determined, positioning pollen development between stages 13 and 15, in the E-L system. With this background, it was determined that *VviPSZ3* was expressed late in the anther and pollen development. Then, *VviPSZ3* was introduced in the mutant genotype of *Atzat4*, a putative ortholog in *Arabidopsis thaliana*. The mutant *Atzat4* (+/-) was characterized phenotypically, as a putative orthologue of *VviPSZ3*, observing defects in the male germline, and showing defects in the pollen tube germination and elongation. Furthermore, *Atzat4* (+/-) presented reduced fertility, with a lower number of seeds per silique, which also, showed reduced viability and germination. It also exhibited a smaller silique size than the WT. The expression of *VviPSZ3* in *Atzat4* restored the wild phenotype corrected the defects in pollen and seeds development, previously characterized in the mutant, suggesting that both transcription factors are orthologous. Finally, VviPSZ3 target genes were identified in *A. thaliana* transgenic plants, which would be involved in processes of pollen grain development and maturation, fundamentally, during the pollen wall and coat formation; moreover, during pollination and double fertilization process. Besides VviPSZ3 target genes were identified, involved in the embryo and seeds development. With these results, it is concluded that VviPSZ3 would be involved in *V. vinifera* cv. Carménère reproductive processes, related to pollen and seed development.

I INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos frutales más importantes a escala mundial, con una producción de aproximadamente 7,5 millones de hectáreas, siendo la vinificación el principal objetivo desde el punto de vista económico, representando un 68% de la producción. Le sigue las uvas frescas para el consumo (30%), las pasas (1,8%) y los productos menores derivados de uvas o desechos de vinificación, que incluyen jugo de uva, productos de gelatina, etanol, vinagre, aceite de semilla de uva, ácido tartárico y fertilizante. (0,2%) (Carmona et al., 2008; Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2016; Palumbo et al., 2019). La superficie chilena cultivada de este frutal es de aproximadamente 135.908 hectáreas, donde los cultivares destinados a la vinificación tinta que lideran el catastro son: Cabernet Sauvignon (41.155 hectáreas), Merlot (11.702 hectáreas) y Carménère (10.249 hectáreas) (Servicio Agrícola y Ganadero, 2017). Por su importancia económica a nivel nacional y mundial, ha resultado de interés comprender el desarrollo vegetativo y reproductivo de este frutal, con el fin de optimizar cuantitativamente y cualitativamente el desarrollo de frutos (Pérez, 2011; Tesis doctoral). Para la optimización de la producción de la vid, y de sus productos derivados, es fundamental comprender el desarrollo floral y frutal de esta especie. Sin embargo, aún es escaso el conocimiento sobre el control genético del desarrollo de los órganos reproductivos de la vid (Palumbo et al., 2019).

1.1 Desarrollo reproductivo de la vid.

1.1.1 Desarrollo de la inflorescencia.

La vid es una especie diploide ($2n = 38$) con un genoma relativamente pequeño de aproximadamente 500 Mb (Jaillon et al., 2007; Velasco et al., 2007; Minio et al., 2017). Esta planta, es una especie perenne con un ciclo de desarrollo reproductivo de un año, donde las etapas iniciales del desarrollo de la inflorescencia ocurren dentro de una yema latente, lo cual dificulta su estudio (Carmona et al., 2008). Las vides silvestres (*Vitis* spp.) de especies americanas y asiáticas, son dioicas, presentando flores femeninas con pistilos funcionales (carecen de anteras o producen estambres doblados y polen estéril), y flores masculinas con anteras funcionales (carecen de un pistilo completamente desarrollado). Estas características son

diferentes en los cultivares empleados para la producción de uvas y vinos, los cuales presentan inflorescencias perfectas que se auto-fecundan (hermafroditas) (Battilana et al., 2013). La aparición de flores hermafroditas durante la domesticación de la vid, ha resultado de gran utilidad para el rendimiento y producción de frutos, eliminando la necesidad de mantener plantas femeninas y masculinas (This et al., 2006; Battilana et al., 2013). El desarrollo de la inflorescencia de la vid ocurre en dos temporadas de crecimiento consecutivo, separados por un periodo de dormancia invernal. Los eventos de inducción, iniciación y diferenciación temprana son críticos para la formación del primordio de inflorescencia, los cuales ocurren durante la primera temporada. Por su parte, la diferenciación final de la inflorescencia ocurre en la segunda temporada de crecimiento con la brotación de las yemas (Carmona et al., 2007; Vasconcelos et al., 2009).

La floración en el momento correcto es decisivo para el éxito reproductivo de las plantas con flores (Leal Valentim et al., 2015). La formación de flores requiere una transición desde una fase vegetativa a una fase reproductiva, la cual es una de las “decisiones” más importantes del ciclo de vida de las plantas (Carmona et al., 2007). El inicio de la floración, así como el desarrollo de las flores y frutos, pueden determinar la calidad y cantidad de la producción de cultivos que consiste en frutas, semillas u órganos vegetativos (Boss and Thomas, 2000; Carmona et al., 2007). La transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva en angiospermas, está determinada por factores ambientales tales como, temperatura, fotoperiodo y disponibilidad de nutrientes, así como también por señales endógenas (Ó'Maoiléidigh et al., 2014; Wahl et al., 2013). Estas señales son integradas por diversos factores de transcripción, los cuales actúan de manera secuencial y coordinada durante la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva (Chen et al., 2018). En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, la transición del meristema apical caulinar (*shoot apical meristem*; SAM) a un meristema de inflorescencia (IM), y posterior formación de flores, se encuentra bien caracterizado (Ó'Maoiléidigh et al., 2014).

Señales de las rutas del fotoperiodo, vernalización, temperatura ambiental y la vía autónoma, son recibidas y transmitidas por transducción de señales. Estas señales, son integradas por *genes de integración del tiempo de la floración* (Leal Valentim et al., 2015). En *Arabidopsis*, *FT FLOWERING LOCUS C (FLC)*, expresado en hojas y meristema, codifica para un factor de transcripción de la familia MADS-box, y actúa como principal represor del

desarrollo floral (Michaels and Amasino, 1999; Li et al., 2008; Chen et al., 2018). Otro gen represor de la floración es *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*, el cual se expresa en plántulas completas, y codifica para un factor de transcripción con dominio MADS-box (Hartmann et al., 2000; Li et al., 2008; Chen et al., 2018). En hojas, FLC y SVP reprimen la expresión de *FLOWERING LOCUS T (FT)*, que codifica una pequeña proteína globular similar a inhibidores de RAF-quinasa. FT es producido en hojas y se desplaza al SAM (Corbesier et al., 2007; Leal Valentim et al., 2015). FT es activado por CONSTANS (CO) en hojas. CO es un componente clave para promover la floración, y codifica para una proteína nuclear de la familia de factores de transcripción B-box, conteniendo una “caja-B” (Wigge et al., 2005; Yoo et al., 2005; Kim et al., 2008b). FT interactúa con el factor de transcripción bZIP FD, y la formación del complejo FT/FD en el SAM, conduce a la activación de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* y *APETALA1 (API)* (Wigge et al., 2005; Leal Valentim et al., 2015). Por otro lado, en el SAM, FLC y SVP reprimen la expresión de *SOC1* el cual codifica para un factor de transcripción del tipo MADS-box (Yoo et al., 2005; Leal Valentim et al., 2015). SOC1 integra señales de múltiples vías y activa la expresión de *LEAFY (LFY)*; interactuando con otro factor de transcripción MADS-box, *AGAMOUS- LIKE 24 (AGL24)* (Leal Valentim et al., 2015). *FT*, *SOC1* y *AGL24* se conocen como genes integradores florales (**Figura 1**) (Blümel et al., 2015).

API y *LFY* son genes de identidad de meristema floral. *LFY* es activado por *SOC1* y codifica para un factor de transcripción similar a proteínas hélice-giro-hélice. Dicho factor de transcripción es necesario y suficiente para la correcta inducción del destino floral, y se considera el regulador principal en la transición de la identidad del meristema floral (Hamès et al., 2008; Winter et al., 2011; Immink et al., 2012). Por otra parte, *API* codifica para un factor de transcripción del tipo MADS-box, el cual participa de la transición floral y regula la expresión de genes involucrados en el desarrollo floral (Kaufmann et al., 2010; Dijk and Molenaar, 2017). *LFY* regula positivamente a *API*, y el compromiso con la flor se determina mediante una interacción de retroalimentación positiva directa entre *API* y *LFY* (Dijk and Molenaar, 2017). Ambos factores de transcripción tienen una serie de genes blanco, activando a aquellos que participarían durante la especificación del meristema floral, y reprimiendo aquellos que regulan negativamente la floración (Ó'Maoiléidigh et al., 2014). Una vez especificado el meristema floral, *API* y *LFY* activan los genes de identidad de los órganos florales. Tales genes

corresponden a genes homeóticos, que luego actúan de manera combinatoria para especificar las identidades de los cuatro verticilos florales (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) (Ó'Maoiléidigh et al., 2014; Chen et al., 2018).

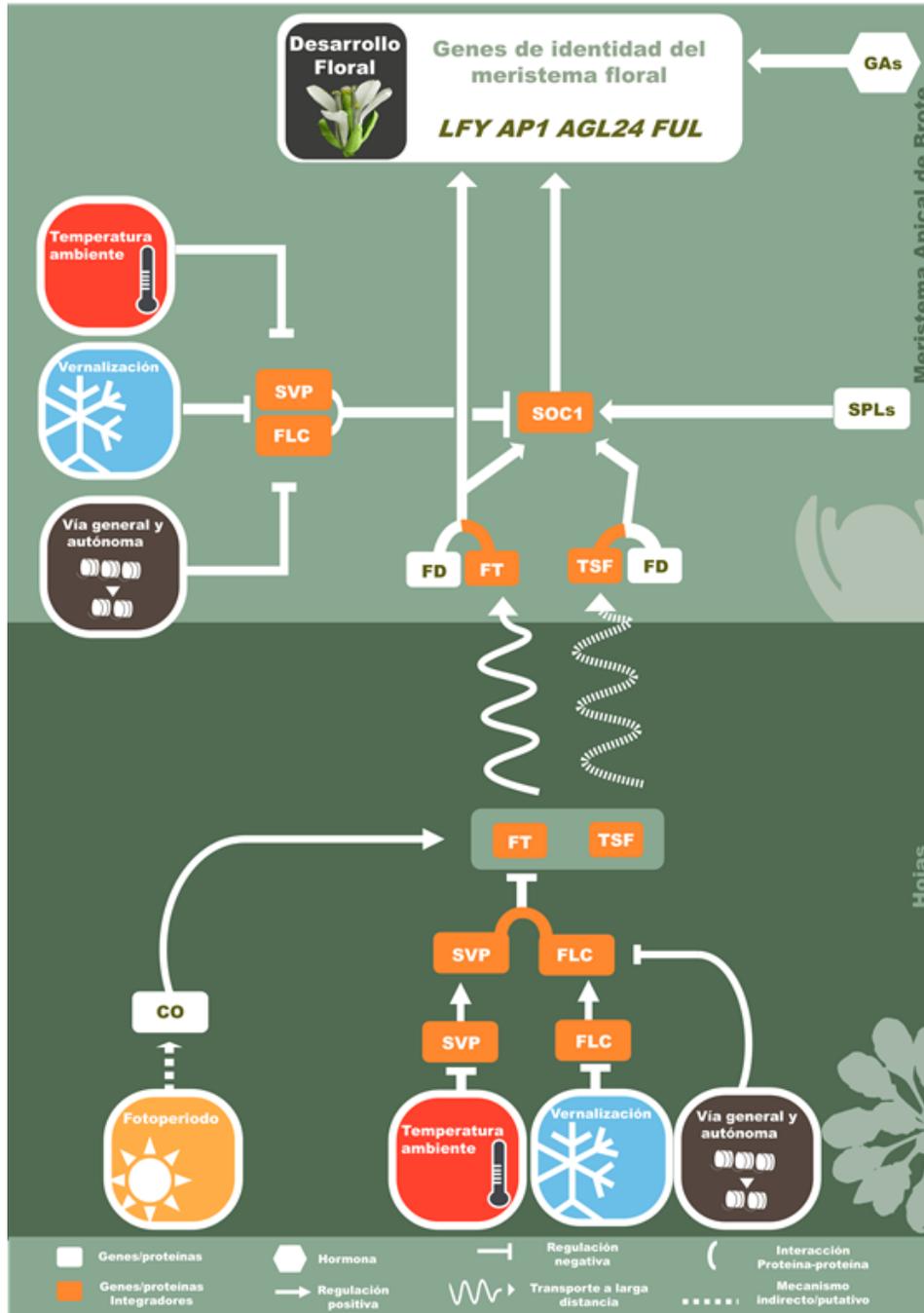


Figura 1. Esquema general de la red regulatoria genética del tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*. Modificado de Bouché et al., 2016. Disponible en <http://www.phytosystems.ulg.ac.be/florid/>.

Los genes de identidad de órganos fueron descubiertos utilizando mutantes de *A. thaliana* y *Antirrhinum majus* y se pudo observar transformaciones homeóticas, es decir, el reemplazo de un tipo de órgano por otro (Ó'Maoiléidigh et al., 2014). Se ha propuesto un “modelo del cuarteto floral”, en donde la identidad de los diferentes órganos florales se especifica durante el desarrollo, mediante complejos proteicos cuaternarios (tetraméricos), compuestos de proteínas de dominio MADS-box tipo MIKC (Theißen, 2001; Becker and Theißen, 2003). Los factores de transcripción con dominio MADS-box se definen por un dominio conservado (MADS-box), en la región N-terminal, y se unen como dímeros al ADN en motivos llamados CARG-boxes (cajas CARG; C-Arich-G-box), cuya secuencia consenso es 5'-CC(A/T)GG-3' o alguna secuencia similar (Grimplet et al., 2016; Theißen et al., 2016; Theißen and Gramzow, 2016). De acuerdo con el modelo del desarrollo floral “ABCE”, los sépalos son especificados por un complejo que consiste en proteínas AP1 y SEPALLATA (SEP), clase A y E, mientras que, AP1, APETALA3 (AP3), PISTILLATA (PI) y SEP, clase A, B y E, forman un complejo de orden superior que determina la identidad de los pétalos. Por otra parte, la especificación de los estambres está determinado por el tetrámero formado por AP3, PI, AGAMOUS (AG) y SEP, clase B, C y E. Finalmente, los carpelos son especificados por un tetrámero compuesto por AG y SEP, clase C y E (**Figura 2**) (Theißen and Saedler, 2001; Chen et al., 2018). El gen de clase A *APETALA2* (*AP2*), a diferencia del resto de las proteínas homeóticas, codifica para un factor de transcripción de la familia EREBP (*ethylene responsive element binding protein*) (Okamuro et al., 1997; Dietz et al., 2010; Theißen et al., 2016). El factor de transcripción *AP2* participa junto a *AP1* en la especificación de sépalos, en tanto que su actividad se superpone junto a los factores de transcripción de clase B, *AP3* y *PI*, en la especificación de los pétalos (Wollmann et al., 2010).

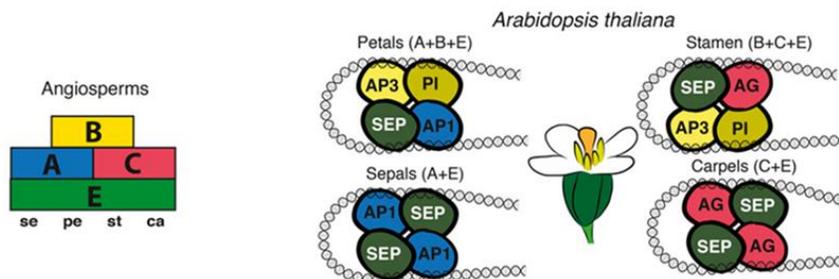


Figura 2. Modelo ABCE del desarrollo floral en *Arabidopsis thaliana*. Modificado de Ruelens et al., 2017. Se: sépalos; pe: pétalos; st: estambres; ca: carpelos.

En la vid se ha definido tres genes de clase A: *VviAPI*, *VviFUL1* y *VviFUL2* (*FRUITFULL 1-2*), los cuales codifican factores de transcripción MADS-box, además de *VviAP2*, implicados en desarrollo de sépalos y pétalos. Los genes *VviAP3a*, *VviAP3b* y *VviPI* se han identificado en relación con la formación de pétalos y estambres. Por otro lado, dos ortólogos de *AtAG* en vides, *VviAG1* y *VviAG2*, han sido identificados e involucrados en el desarrollo de estambres y carpelos. Adicionalmente, *VviAGL6a* y *VviAGL6b* (*AGAMOUS LIKE a-b*) estarían implicados en el desarrollo de los filamentos de estambres en las vides. Finalmente, *VviSEP1*, *VviSEP2*, *VviSEP3* y *VviSEP4* participan controlando la diferenciación de los órganos florales (Palumbo et al., 2019).

La expresión de los genes homeóticos es más alta poco después de la aparición de los primordios de cada órgano floral y luego disminuye durante la maduración de la flor (Takatsuji et al., 1994). Los factores de transcripción homeóticos estarían regulando a los genes implicados en el desarrollo floral. Muchos de los genes que participan en las primeras etapas del desarrollo floral son regulados directamente por los factores homeóticos. Sin embargo, a medida que la flor va madurando, disminuye la participación de estos reguladores maestros (Thomson and Wellmer, 2019). Luego de la expresión de los genes que codifican para factores de transcripción del tipo MADS-box y de la formación de cada primordio floral, una serie de factores de transcripción, aún desconocidos, desempeñan papeles cruciales en desarrollo de cada verticilo floral.

1.1.2 Desarrollo de antera y polen

En angiospermas, el gametofito masculino (grano de polen) juega un papel fundamental en la fertilidad de la planta y la producción de cultivos, mediante la generación y entrega de los gametos masculinos al saco embrionario, para la doble fecundación (Borg et al., 2009; Gómez et al., 2015). Por consiguiente, el desarrollo de un grano de polen funcional es crítico para la formación de las semillas, manteniendo así la diversidad genética (Gómez et al., 2015).

Luego de la formación de los primordios florales, una serie de factores de transcripción estaría regulando el desarrollo de los órganos florales, regulando la expresión de genes blanco

en compartimentos específicos y diferentes tipos celulares de la antera (Kobayashi et al., 1998). En *A. thaliana*, el desarrollo de antera y polen se encuentra bien caracterizado. El desarrollo de la antera, en esta especie modelo, se ha dividido en 15 etapas, las cuales van desde la división de una única célula arquesporial, hasta la formación del microsporangio maduro (Gómez et al., 2015). Para el proceso del desarrollo de los estambres debe haber una coordinada interacción entre los tejidos esporofítico y gametofítico (Wilson and Zhang, 2009). La formación del gametofito masculino comienza con divisiones periclinales en varias células hipodérmicas dentro del primordio de la antera, desarrollándose así las arquesporas. Luego, las células arquesporales se dividen mitóticamente para formar las células esporógenas primarias internas, que luego se convierten en células madres del polen (PMC o microsporocito) y las células parietales primarias (PP) (Wilson and Yang, 2004). Las PMCs, a través de divisiones meióticas, darán origen a las microsporas, mientras que las PPs pasarán por una serie de divisiones mitóticas adicionales, para formar el tejido esporofítico de las capas de la antera. Las PP se dividen primero en células endoteliales y en células parietales secundarias (SPC) y luego las SPCs se dividen para formar la capa de células medias y el *tapetum* (Wilson and Zhang, 2009). Finalmente, se obtienen tres capas de antera rodeando al microgametofito: el endotecio, la capa media y el *tapetum* (Wilson and Yang, 2004; Wilson and Zhang, 2009).

El desarrollo del gametofito masculino en angiospermas consiste en tres etapas principales: (i) microsporogénesis, (ii) desarrollo post-meiótico de las microsporas, y (iii) microgametogénesis. Durante la microsporogénesis, las PMCs diploides sufren meiosis, generando cuatro microsporas haploides rodeadas de una pared de calosa, este último estadio se conoce como tétrada. Luego, durante la maduración de la microspora, el *tapetum* sufre muerte celular programada, resultando en la degradación de la calosa y posteriormente la liberación de las microsporas. Finalmente, en la microgametogénesis cada microspora pasa por dos procesos mitóticos sucesivos, resultando un grano de polen tri-celular (algunas especies presentan granos de polen bi-celular) (Borg et al., 2009; Gómez et al., 2015) (**Figura 3**). Durante la primera división mitótica, las microsporas se dividen asimétricamente produciendo una célula vegetativa, que dará origen al tubo polínico y a una célula generativa. Luego, durante mitosis II, la célula generativa se divide formando dos células espermáticas, permitiendo así la doble fecundación, permitiendo producir el embrión y el endospermo (Borg et al., 2009; Gómez et al.,

2015). La ocurrencia de PMII hacia la formación de dos células espermáticas, no es la misma en todas las especies de plantas. En la mayoría de las angiospermas, PMII transcurre después de la germinación del polen, y la liberación del polen ocurre en estadio bicelular (Lora et al., 2009) (Lora et al., 2009). En *A. thaliana*, la PMII ocurre antes de antesis, en cambio, en la vid, se ha descrito que la formación de las células espermáticas transcurre durante la polinización (Abreu et al., 2006; Borges et al., 2008).

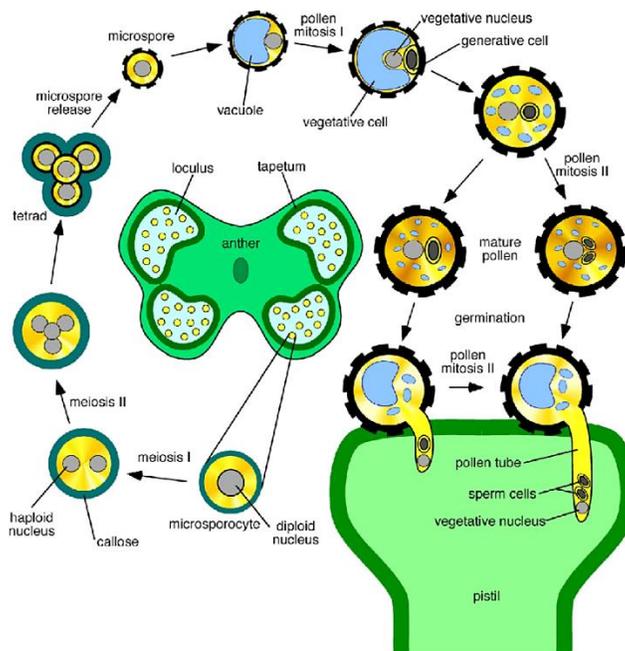


Figura 3. Diagrama esquemático del desarrollo del polen en *Arabidopsis* (Honys et al., 2006).

Las células gametofíticas están rodeadas por la pared del polen, la cual consiste de dos capas: intina y exina. La intina es la capa más interna y subyace a la exina, esta capa tiene un origen gametofítico y consta de enzimas hidrolíticas, proteínas hidrofóbicas, celulosa, hemicelulosa y polímeros pécticos, similares a la pared celular primaria (Ariizumi and Toriyama, 2011). Por su parte, la exina tiene un origen esporofítico, y se divide en *nexina* y *sexina*. Esta última se divide en el *tectum* y *baculum* (Lyu et al., 2019). La exina consiste de esporopolenina, un material robusto constituido por compuestos alifáticos, tales como ácidos grasos y compuestos fenólicos (Ariizumi and Toriyama, 2011; Lyu et al., 2019). La formación

de la pared comienza en el estadio de tétrada, a través de la síntesis de *primexina*. Ésta funciona como receptor de la esporopolenina, proporcionando una subestructura ideal y enzimas necesarias para la deposición y polimerización de la esporopolenina (Ariizumi and Toriyama, 2011; Lyu et al., 2019).

En *Arabidopsis*, el androceo consiste de seis estambres: cuatro largos y dos cortos. El filamento sirve como conducto para agua y nutrientes, mientras que, la antera tiene una estructura bilateralmente simétrica, de cuatro lóbulos, cada uno de los cuales contiene un microsporangio (saco polínico), dentro del cual se desarrolla el polen (Cardarelli and Cecchetti, 2014). Por su parte, el androceo de la vid está compuesto por cinco estambres. Cada estambre consta de un filamento largo, al final del cual, hay una antera bilocular que contiene cuatro sacos de polen (Vasconcelos et al., 2009). El polen maduro tiene de 25 a 30 μm de longitud y de 12 a 15 μm de ancho. Normalmente, el polen presenta una forma sub-esférica a triangular, debido a la presencia de tres surcos con tres poros, es decir, es un grano de polen tri-colporado (Abreu et al., 2006; Vasconcelos et al., 2009; Alva et al., 2015). A diferencia de *Arabidopsis*, los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de anteras y granos de polen en la vid son aún desconocidos.

1.1.3 Desarrollo del fruto.

El grano de polen entra en su fase funcional o progámica, luego de que cae sobre el estigma (polinización). El polen se activa por rehidratación, germina y produce un tubo de polen largo que crece en los tejidos del pistilo, donde se producen una serie de señales químicas y moleculares, que orientan al tubo polínico. El crecimiento del tubo polínico termina con una doble fertilización después de llegar al óvulo (Selinski and Scheibe, 2014; Hafidh et al., 2016). Durante la doble fertilización, una célula espermática fertiliza la ovocélula para formar el cigoto, mientras que la otra célula espermática se fusiona con los dos núcleos polares de la célula central, que dará origen al endospermo triploide (Selinski and Scheibe, 2014). Las células sinérgidas secretan gran cantidad de péptidos que incluyen moléculas atrayentes. En especies de plantas dicotiledóneas, tales como *Torenia* y *Arabidopsis*, los CRP “*defensin-like*”, como

LURE, se secretan como atrayentes de los tubos polínicos (Okuda et al., 2009; Higashiyama and Takeuchi, 2015; Higashiyama and Yang, 2017). Luego de ocurrida la fertilización, en *Arabidopsis*, el fruto entra en una etapa en la cual el crecimiento y la maduración del ovario están estrechamente coordinados con el desarrollo de la semilla. Además, las paredes celulares de tejidos del fruto de *Arabidopsis* se lignifican, lo cual le otorga rigidez y posteriormente, ayuda en la apertura del fruto maduro (Spence et al., 1996; Seymour et al., 2013). Por otro lado, el desarrollo de frutos carnosos implica la división celular y la expansión de los tejidos del ovario, pero sin la fase de lignificación, como en los frutos secos (Seymour et al., 2013). En la vid, la mayoría de los cultivares tienen autofecundación, sin embargo, varios de ellos requieren polinización cruzada para alcanzar la madurez completa (Muñoz-Rodríguez et al., 2011).

La formación de la baya de la vid depende de dos estímulos: la polinización y la fertilización. Esta última ocurre 2-3 días post-antesis (DPA), desencadenando el desarrollo del fruto (Kühn and Arce-Johnson, 2012). El desarrollo de la baya de la vid sigue una doble curva sigmoidea. La primera etapa representa un rápido crecimiento que ocurre inmediatamente después de la floración, con un aumento en el tamaño de la baya, por la división y elongación celular. Los frutos son fotosintéticos, el contenido de azúcar de la baya se mantiene bajo, mientras que los ácidos orgánicos se acumulan (Dokoozlian, 2000). La segunda etapa representa una fase de latencia, la acumulación de ácido orgánico, alcanza su máximo nivel, las bayas se mantienen firmes, pero comienzan a perder clorofila. Finalmente, la tercera etapa se caracteriza por un segundo aumento rápido en el tamaño de las bayas, por elongación celular, acompañado por la acumulación de azúcares, una disminución en el contenido de ácidos, el desarrollo de color y la maduración de la baya (Dokoozlian, 2000; Chai et al., 2014). Algunos frutos se desarrollan sin ocurrir la fecundación, por lo cual, estos frutos no presentan semillas y se les denomina frutos partenocárpico. Esto sugiere que las señales del polen, durante la polinización, también son necesarias para preparar el ovario para la formación de frutos (Dauelsberg et al., 2011). Sin embargo, estos frutos presentan un menor tamaño final. Se ha descrito que el desarrollo de la semilla afecta el crecimiento y desarrollo de las bayas, ya que estas se desarrollan coordinadamente (Ristic and Iland, 2005). La partenocarpia, es un evento causado por una defectuosa fecundación del óvulo, debido a una incapacidad del polen para germinar. Esto estaría relacionado con un desarrollo anormal del polen, lo que impide la liberación de las

células espermáticas dentro de los ovarios y la consiguiente fecundación (Alva et al., 2015; Keller, 2015). La coexistencia de frutos partenocárpicos, pequeños (<3 mm) o medianos (3-6 mm), con frutos de tamaño normal en el mismo racimo, se denomina “*millerandage*” (Alva et al., 2015). Los frutos pequeños del tipo “*shot berries*”, son esencialmente detenidos en la etapa de ovario, permanecen pequeños, verdes y duros, y son ricos en taninos (Keller, 2015). Además, no hay acumulación de hexosas, no se producen antocianinas y tienen elevados contenidos de ácidos orgánicos al momento de la cosecha, lo cual afecta negativamente a la calidad organoléptica del vino (Gainza-Cortés, 2011; Tesis doctoral). La ocurrencia de este fenómeno ha sido relacionada con alteraciones en el metabolismo de poliaminas y con la disponibilidad, asimilación y transporte de micronutrientes esenciales, tales como zinc, molibdeno y boro (Callejas et al., 2004; González, 2013; Tesis doctoral). Además, la influencia de factores ambientales, genéticos, fisiológicos y edáficos (Callejas et al., 2004; Göktürk and Harmankaya, 2005). Recientemente, la partenocarpia se ha asociado a alteraciones en los procesos morfogenéticos asociados al desarrollo de los órganos reproductores de la vid y a los eventos involucrados en la formación del polen (Gainza-Cortés et al., 2012; Alva et al., 2015). Las alteraciones morfológicas y funcionales del polen se han asociado a la ocurrencia de frutos partenocárpicos, en vides de diferentes cultivares, mostrando variaciones entre cultivares y dentro de un mismo cultivar en diferentes estaciones del crecimiento. Por lo tanto, existiría una correlación positiva entre las alteraciones morfológicas del grano de polen y el desarrollo de frutos partenocárpicos. Se ha observado que en condiciones óptimas de crecimiento, la calidad del polen y su capacidad germinativa podrían ser las principales causas de la formación de frutos partenocárpicos en campo (Alva et al., 2015).

1.2 Mecanismos moleculares implicados en desarrollo de antera y polen.

1.2.1 Regulación del desarrollo de antera y polen en *A. thaliana*.

En *Arabidopsis* se encuentra bien caracterizada la red de regulación genética involucrada en el desarrollo de las anteras y la formación del grano de polen, y diversos genes han sido

caracterizados en su especificación (Gómez et al., 2015). Esto gracias al desarrollo y análisis de mutantes masculinos estériles (Wilson and Zhang, 2009). Se han identificado 13.977 genes que se expresan durante el desarrollo del gametofito masculino y aproximadamente 15.000 en el gametofito masculino y anteras (Honys and Twell, 2004; Wilson and Zhang, 2009).

El primer implicado en la red de regulación genética del desarrollo de anteras y polen es *AG*, el cual, además, participa de la especificación de los estambres junto a genes homeóticos de clase B y E. *AG* muestra una expresión temprana y prolongada durante la formación de carpelos y estambres. Por lo tanto, *AG* muestra expresión temprana durante los primeros estadios de la iniciación floral y expresión tardía en diferentes regiones de los órganos reproductores, participando de la morfogénesis y dehiscencia de las anteras, y de la formación y elongación de los filamentos (Ito et al., 2004; Wilson and Zhang, 2009; Gómez et al., 2015). *AG* activa a *SPOROCTELESS / NOZZLE (SPL / NZZ)*, un factor de transcripción temprano en la activación y diferenciación celular, siendo esencial para el inicio de la esporogénesis femenina y masculina (Schiefthaler et al., 1999; Yang et al., 1999).

Las etapas tempranas durante la especificación de las anteras están reguladas por diversos genes ya descritos. El número de células arqueosporiales está regulado, en parte, por *EXTRA SPOROGENOUS CELLS/EXCESS MICROSPOROCTES1 (EXS/EMS1)* (Canales et al., 2002; Zhao et al., 2002) y por *TAPETAL DETERMINANT 1 (TPD1)* (Yang et al., 2003). Además, en la especificación temprana de la antera, participa *BARELY ANY MERISTEM 1 y 2 (BAMI/BAM2)*, los cuales tienen función redundante durante la especificación de las capas de la antera (Hord et al., 2006). *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES 1 y 2 (SERK1/SERK2)* participan de la diferenciación celular y del desarrollo temprano del *tapetum* (Albrecht et al., 2005; Wilson and Zhang, 2009; Gómez et al., 2015).

En el desarrollo del *tapetum* participan *DYSFUNCTIONAL TAPETUM 1 (DYTI)*, *ABORTED MICROSPORE (AMS)* y *MALE STERILITY 1 (MS1)*, los cuales son esenciales para su especificación, su correcto funcionamiento y el desarrollo de granos de polen viables (Sorensen et al., 2003; Vizcay-Barrena and Wilson, 2006; Zhang et al., 2006; Yang et al., 2007). Por otra parte, *MYB33* y *MYB65* parecen actuar de manera redundante en el desarrollo de la

antera, siendo también importantes en el desarrollo del *tapetum* (Millar and Gubler, 2005), al igual que *MYB80* (*MYB103*) (Zhang et al., 2007; Wilson and Zhang, 2009; Gómez et al., 2015).

Por otra parte, se han descrito diversos genes participando de la microgametogénesis del polen. Por ejemplo, *CDKA;1* (*CYCLIN-DEPENDENT KINASE A;1*), el cual tiene un rol esencial en la división de la célula generativa, hacia la formación de las dos células espermáticas, necesarias para la doble fertilización (Iwakawa et al., 2006). Por otra parte, *E2FA* es requerido para la progresión del ciclo celular. Cuando no está interactuando con RBR1, E2FA activa la expresión de genes necesarios para la progresión de G1/S del ciclo celular. Un importante gen blanco de E2FA es *FBL17* (Sabelli and Larkins, 2009; Desvoves et al., 2014; Glöckle et al., 2018). *FBL17* (*F-BOX-LIKE 17*), el cual controla la maquinaria del ciclo celular para promover la división de células germinales masculinas, mediando la degradación del inhibidor de *CDKA;1*, la proteína KRP6 (Kim et al., 2008).

1.2.2 Factores de transcripción del tipo zinc-finger.

Los avances en genética y tecnologías genómicas han permitido tener progresos significativos en la comprensión del desarrollo gametofítico masculino a nivel molecular (Wilson and Zhang, 2009). En la especie modelo *Arabidopsis*, la red de genes que participan en el desarrollo del polen, comprende un complejo sistema de expresión e interacciones génicas, los cuales también parecen estar conservados en otras especies vegetales (Gómez et al., 2015). Sin embargo, en especies no modelos, como la vid, el conocimiento de los genes que estarían participando en el desarrollo del polen es escaso.

Luego de que ha ocurrido la especificación de cada órgano floral, en el desarrollo de los estambres y el polen, se ha observado un conjunto de factores de transcripción que regularían la expresión de varios genes blanco. Éstos operarían en distintas estructuras y tipos celulares dentro de la antera, con sincronización específica, y controlando así, eventos del desarrollo de la línea germinal masculina (Kobayashi et al., 1998). Dentro de los factores de transcripción que estarían participando, luego de la especificación de los primordios florales, se encuentran los de tipo zinc-finger. Las proteínas zinc-finger (ZFP) juegan un rol fundamental en una serie de

funciones celulares, tales como, la regulación transcripcional, la unión a ARN, la regulación de la apoptosis y las interacciones proteína-proteína (Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008). El dominio zinc-finger es propuesto como un dominio de unión al ADN plegado, independientemente que puede reconocer secuencias de ADN específicas. Las ZFP se unen con iones de zinc a través de su cisteína (Cys) e histidina (His) (Li et al., 2013). Entre los diferentes tipos de zinc-finger, los de tipo C₂H₂ están dentro de los más estudiados y abundantes en eucariotas (Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008). Los C₂H₂-ZFP están altamente involucrados en la remodelación de la cromatina y la regulación transcripcional (Lyu and Cao, 2018). Estos factores de transcripción se componen de dos Cys y dos His, que forman un motivo conservado junto con el Zn²⁺, con un centro que consiste de un α -hélice y una lámina- β antiparalela de doble cadena, de modo que el dominio C₂H₂ zinc-finger (C₂H₂-ZF) sea estable y relativamente independiente (Wang et al., 2019). Los C₂H₂-ZFP son en su mayoría específicos para plantas y contienen una secuencia conservada QALGGH dentro del dominio zinc-finger (Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008). Este dominio no se ha encontrado en otros organismos, lo que sugiere que podría haber evolucionado para un proceso regulador específico único en plantas (Wang et al., 2019). A pesar de que una mutación en la secuencia QALGGH afecta significativamente la unión del C₂H₂-ZFP, no todos contienen dicho dominio (Lyu and Cao, 2018). Análisis genómicos han identificado 176 genes para C₂H₂-ZFP en *Arabidopsis* y 189 en el genoma del arroz (Englbrecht et al., 2004; Agarwal et al., 2007). Recientemente se han identificado 98 genes para C₂H₂-ZFP en el genoma de la vid (Arrey-Salas et al., 2021). Este tipo de factores de transcripción se ha asociado a la respuesta ante diversos estreses abióticos, tales como, bajas temperaturas o salinidad (Wang et al., 2019). También, se ha observado un rol importante durante el desarrollo floral. Se ha demostrado que C₂H₂-ZFP se expresan en SAM o en hojas, regulando la inducción floral. La pérdida de su función da como resultado una floración temprana o tardía. También, éstos estarían actuando sobre el primordio de los órganos florales (Lyu and Cao, 2018). El gen *SUPERMAN* (*SUP*) codifica un represor transcripcional con un dominio de unión al ADN C₂H₂-ZF y un motivo de represión EAR (*ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif*). Se ha demostrado que este gen es importante en el mantenimiento del límite entre estambres y carpelos (Sakai et al., 1995; Dathan et al., 2002; Lyu et al., 2019). La función específica de *SUP*, en el mantenimiento del límite de dichos verticilos, es reprimir la expresión de los reguladores *AP3* y *PI*. (Prunet et al., 2017; Lyu and Cao, 2018). En relación al desarrollo

de órganos florales, se ha descrito una serie de genes que codifican para este tipo de factores de transcripción, los cuales han sido implicados en el desarrollo pistilos y anteras/polen (Takatsuji, 1998; Lyu and Cao, 2018).

Siete zinc-finger han sido descritos como específicos de las anteras en *Petunia hybrida*, los cuales fueron expresados secuencialmente y transitoriamente durante el curso del desarrollo de la antera, lo que sugiere que podrían formar una cascada de regulación para controlar el desarrollo del órgano masculino (ZPT3-2, ZPT2-5, ZPT4-2, ZPT4-3, ZPT3-1, ZPT4-1, ZPT2-6). Estos zinc-finger están clasificados según tamaño, número de zinc-finger (dos, tres y cuatro) y las separaciones entre estos dominios (Kobayashi et al., 1998). Además, se ha observado que el silenciamiento de algunos de estos genes conduce a la formación de polen aberrante y aborto prematuro del mismo (Kapoor et al., 2006). Uno de los zinc-finger descrito por Kobayashi et al. (1998), *PEThy-ZPT3-2*, que codifica una proteína con tres motivos zinc-finger, que preside a otros seis genes durante las primeras etapas del desarrollo de la antera, fue renombrada de acuerdo a su función estudiada con posterioridad (Kobayashi et al., 1998; Kapoor et al., 2002). Este zinc-finger, se denominó *TAZI* (*Tapetum development zinc-finger protein 1*). El análisis de plantas transgénicas, en los que el gen *TAZI* fue silenciado por co-supresión, demostró que la actividad de *TAZI* es esencial para la fase de desarrollo post-meiótica del *tapetum*, que a su vez juega un papel esencial en la maduración de las microsporas (Kapoor et al., 2002). Otro de los siete zinc-finger descritos, *PEThy-ZPT2-5*, fue renombrado como *MEZI* (*Meiosis associated zinc-finger protein 1*), demostrando que el silenciamiento de *MEZI* afecta severamente los procesos de la meiosis en la línea germinal masculina. Plantas transgénicas, con *MEZI* silenciado, muestran graves defectos en la condensación de los cromosomas. La meiosis aberrante, generalmente resulta en la distribución desigual del ADN en las células hijas y la división celular excesiva, produciendo hasta 10 microsporas con cantidades variables de ADN, generando así un aborto prematuro del polen (Kapoor and Takatsuji, 2006). Otro de los siete zinc-finger estudiados con posterioridad fue *PEThy-ZPT3-3*, el cual es un gen que codifica para un factor de transcripción que estaría siendo expresado en tejidos de transmisión estigmática y estilar. Al fusionar el promotor de *PEThy-ZPT3-3* al gen reportero *GUS* (β -glucuronidasa), se pudo observar actividad de la proteína en la zona secretora del estigma, la cual sirve como vía

de crecimiento del tubo polínico, además de una actividad GUS menor en el receptáculo, la parte inferior del ovario y las anteras (Kubo et al., 1998).

En *A. thaliana* se han descrito dos genes redundantes que codifican para dos factores de transcripción del tipo C₂H₂, zinc-finger, *DAZ1/DAZ2*, los cuales serían necesarios para una correcta división de las células germinales y para la acumulación de las ciclinas mitóticas, durante el desarrollo del polen. Asimismo, éstos son esenciales para la fusión de los gametos durante la fecundación. Los factores de transcripción *DAZ1/DAZ2* también presentan un motivo de represión transcripcional EAR, que media la función de estos en la línea germinal masculina, siendo necesarios para la represión transcripcional de genes relacionados al desarrollo masculino (Borg et al., 2014).

En *Brassica campestris* se caracterizó un gen que codifica para un C₂H₂-ZFP denominado *BcMF20 (Brassica campestris Male Fertility)* y que se expresa fuertemente en *tapetum* y polen. La expresión de este gen comienza en estado unicelular y se mantiene durante el estado de polen maduro (Han et al., 2011). La inhibición de la expresión del gen conduce a menor cantidad de polen y una reducida germinación del polen. Además, se observa el colapso de los granos de polen en plantas transgénicas y defectos durante el desarrollo de la pared del polen (Han et al., 2018).

En *Arabidopsis* se ha descrito una ZFP denominada *MAZI (Male Fertility-Associated Zinc Finger Protein 1)*, la cual se expresa en estadios tempranos del desarrollo de las anteras. El fenotipo mutante de *maz1* muestra reducida fertilidad, desarrollo anormal y aborto de los granos de polen. Los defectos en la línea germinal masculina estarían dados por un patrón anormal de acumulación de exina y de ausencia de intina, por lo tanto, defectos durante el desarrollo de la pared del polen (Lyu et al., 2019).

Recientemente, se identificaron 98 genes que codifican para C₂H₂-ZFP en el genoma de la vid. El análisis de la expresión de algunos de dichos genes, mostró un patrón de expresión diferencial en el desarrollo de la inflorescencia en la vid cv Carménère. Además, análisis histoquímicos sugieren que dos de los C₂H₂-ZFP, *VviZFP13* y *VviZFP68* podrían estar involucrados en el desarrollo del polen (Arrey-Salas et al., 2021).

1.2.3 VviPSZ3: factor de transcripción del tipo C₂H₂ zinc-finger en *Vitis vinifera*.

El gen *VviPSZ3* codificaría para un C₂H₂-ZFP. Este gen fue aislado a partir de resultados que demostraron que es fuertemente reprimido en bayas sin semillas, y por presentar una alta similitud de secuencia con otros zinc-finger asociados al desarrollo reproductivo en otras especies como *P. hybrida* y *Silene latifolia* (*PhZPT3-3* y *SIZPT3-1*) (González, 2013; Tesis doctoral). *SIZPT3-1* se expresa altamente en botones de flores masculinas y poco en flores femeninas de *S. latifolia* (Jenkins et al., 2005). Este gen codifica para “*Vitis vinifera pollen and seed zinc-finger protein*”, una proteína de 359 aminoácidos y putativo factor de transcripción del tipo zinc-finger. El análisis de la secuencia aminoacídica deducida de *VviPSZ3* permitió establecer tres motivos conservados del tipo C₂H₂ zinc-finger, una caja B (RRRRSKRXR) que actuaría como señal de localización nuclear, una caja L (región rica en leucina, EEXXAXCLXXL) entre los dos primeros zinc-finger, y una caja EAR (DLNL) en el extremo C-terminal (Ohta et al., 2001; González, 2013; Tesis doctoral). Este gen, estaría expresándose en flores cerradas y bayas en estadio de envero, en las cuales ocurren importantes eventos morfogenéticos y fisiológicos. La expresión de *VviPSZ3* ocurriría principalmente en polen y en semillas, por lo cual, se piensa que estaría cumpliendo distintos roles durante el desarrollo reproductivo de vides (González, 2013; Tesis doctoral). Por otra parte, se estableció que este gen presenta un nivel de expresión significativamente más alto en un cultivar con baja tasa de desarrollo de frutos partenocárpicos, como es el cultivar Cabernet Sauvignon, al ser comparado con el cultivar Carménère, el cual presenta una alta tasa de desarrollo de frutos partenocárpicos. Además, ello estaría correlacionado con la baja expresión del gen en bayas partenocárpicas (González, 2013; Tesis doctoral). El gen *VviPSZ3* se ha descrito como putativo ortólogo del gen *ZAT4* de *A. thaliana* (AT2G45120), ya que al evaluar plantas mutantes insercionales *zat4*, complementados con este gen, se observó que se recupera el fenotipo del WT, en lo que respecta al número de semillas por silicuas. Por este motivo se estableció que ambos genes estarían implicados en el desarrollo reproductivo en cada especie evaluada (Caris, 2015, Tesis de pregrado).

La regulación de la expresión del gen *VviPSZ3*, podría estar explicado por diferentes elementos en *cis*, que fueron identificados en la región promotora, mediante análisis *in silico*.

Sitios de unión, a factores de transcripción, relacionados con el desarrollo floral y frutal en vides, fueron encontrados en la tesis doctoral de González (2013). Dos secuencias blanco para factores del tipo SQUAMOSA, tales como AP1 o FUL, fueron identificados en la región río arriba de este gen. Se sugirió que *VviPSZ3* puede ser modulado en su expresión por los factores de transcripción VAP1 (*Vitis* APETALA1), recientemente renombrado a VviAP1, o por VFUL-L (*Vitis* FRUITFUL-like), recientemente renombrado a VviFUL2 (Calonje et al., 2004; González, 2013; Tesis doctoral; Grimplet et al., 2014; Palumbo et al., 2019). Además, la secuencia promotora presenta sitios de unión a elementos regulatorios asociados a la expresión polen-específica, al igual que en la región promotora de *AtZAT4*, presentando ambas secuencias promotoras, una alta similitud. (Bate and Twell, 1998; Zhou et al., 2010).

Con estos antecedentes, resulta de interés evaluar el rol de *VviPSZ3* durante el desarrollo de anteras y polen, así como también, en el desarrollo de las semillas en *V. vinifera*, utilizando como modelo de estudio al cultivar Carménère. Éste tiene una alta importancia dentro de la industria vitivinícola nacional (Servicio Agrícola y Ganadero, 2017). Además, presenta problemas de fertilidad asociados a la abscisión de flores o la formación de frutos partenocárpicos, ocasionando pérdidas de entre un 20% a un 70% (Callejas et al., 2004). Para llevar a cabo este estudio se utilizó un mutante insercional del gen *AtZAT4* en la especie modelo *A. thaliana*. A la fecha, el papel de este C₂H₂-ZFP en el desarrollo reproductivo de *Arabidopsis* no ha sido caracterizado. Por esta razón, primero se realizó la caracterización fenotípica del mutante *Atzat4*, y con los resultados obtenidos, se evaluó los efectos de la complementación del mutante con el gen *VviPSZ3*, en el desarrollo del polen y las semillas. Ello, puesto que ambos genes han sido propuestos como putativos ortólogos (Caris, 2015; Tesis de pregrado; González, 2013; Tesis de doctoral).

II HIPÓTESIS DE TRABAJO

El gen *VviPSZ3* codifica para un factor de transcripción del tipo C₂H₂ zinc-finger que está involucrado en la red regulatoria del desarrollo reproductivo de *Vitis vinifera*, modulando la expresión de genes implicados en el desarrollo del polen y semillas.

III OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Posicionar al gen *VviPSZ3* dentro de la red regulatoria asociada al control del desarrollo floral y frutal en vides.

3.2 Objetivos específicos.

- 1) Determinar la temporalidad de expresión del gen *VviPSZ3* en el desarrollo de anteras y polen de *V. vinifera* cv. Carménère.
- 2) Evaluar los cambios fenotípicos generados por la expresión constitutiva del gen *VviPSZ3* sobre el fenotipo de líneas mutantes *zat4* de *A. thaliana*.
- 3) Identificar genes cuya expresión es regulada por el factor de transcripción *VviPSZ3*, en plantas de *A. thaliana* *zat4* complementadas con el gen *VviPSZ3* de *V. vinifera*.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) y mutantes con inserción de T-DNA en la región promotora de *AtZAT4* (CS841944; *Atzat4* (+/-)), fueron obtenidas de *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, <https://abrc.osu.edu/>). Además, se contó con plantas transgénicas, transformadas con el vector binario pCAMBIA1303, conteniendo el gen *VviPSZ3* controlado por el promotor CaMV 35S (estas plantas fueron nombradas prom35S::*VviPSZ3/Atzat4*). Todas las plantas, se cultivaron en sustrato estéril compuesto de perlita, vermiculita y turba (1:1:1) y mantenidas en condiciones de invernadero (Universidad de Talca, Chile) con fotoperiodo de día largo (16 h luz / 8 h oscuridad). Las plantas fueron fertilizadas cada dos semanas con Ultrasol® de crecimiento (SQM Santiago, Chile), y mantenidas hasta la obtención de estructuras reproductivas para los ensayos de fenotipado y extracción de material genético. Otro set de plantas, se mantuvo bajo similares condiciones de fotoperiodo y de fertilización, pero bajo cámara de crecimiento (Universidad de Talca, Chile).

Accesiones clonales de *Vitis vinifera* cv. Carménère fueron mantenidas bajo condiciones de campo, en cuarteles de la Viña Casa Silva, en la hacienda Los Lingues, en San Fernando, Región del Libertador Bernardo O'higgins, Chile (34°32'18.3"S 70°58'00.6"W). El material floral fue obtenido de la temporada 2018-2019. Se tomaron muestras florales, las cuales fueron colectadas manualmente y de forma aleatoria, de acuerdo al tamaño de la inflorescencia y los estadios fenológicos en el sistema Eichhorn and Lorenz (E-L) (1977) modificado por (Coombe, 1995). Las muestras florales, fueron colectadas en los mismos estadios del desarrollo para dos actividades: i) fijar las muestras en etanol-ácido acético (3:1), para la tinción de la línea germinal masculina, y ii) extracción de ARN, para el análisis de genes involucrados en el desarrollo de polen.

Plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi generación T1, fueron obtenidas por transformación de discos de hojas con *Agrobacterium tumefaciens* en la Universidad Católica de Valparaíso, Región de Valparaíso, Chile. Estas plantas fueron transformadas con el vector pCAMBIA1303, conteniendo las regiones promotoras de alrededor de 2000 pb de *VviPSZ3* y *AtZAT4* fusionadas al gen reportero *GUS* (prom*VviPSZ3*::*GUS*; prom*AtZAT4*::*GUS*).

Estas plantas fueron mantenidas en invernadero (Universidad de Talca, Chile) bajo condiciones similares a *A. thaliana* hasta la obtención de estructuras florales.

4.2 Búsqueda de genes implicados en desarrollo floral en vides.

Se utilizó el genoma de la vid 12X.v0 (Jaillon et al., 2007) (<https://www.genoscope.cns.fr/vitis/>) para realizar la búsqueda de genes homólogos de *A. thaliana* descritos en literatura, involucrados en la identificación de los órganos florales (*API*, *AP3*, *PI*, *AG*, *SEP1* y *SEP3*) y en el desarrollo de antera y polen (*AMS*, *MYB80*, *EMS1*, *DYT1*, *MYB33*, *MS1*, *BAM1*, *SERK1*, *CDKA;1*, *FBL17*, *E2FA*). Para cada gen seleccionado se realizó búsqueda de su secuencia nucleotídica en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se diseñó partidores específicos para la región codificante, utilizando primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Por otra parte, se realizaron partidores específicos para el gen *VviPSZ3* de acuerdo a la secuencia disponible en el genoma de la vid (**Tabla1**).

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de partidores utilizados en esta tesis.

Gen	Secuencia del partidor (5'→3')	Temperatura de annealing (°C)
<i>AtFbox</i>	F: TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT	58
	R: GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA	58
<i>AtZAT4</i>	F: AGTAACATCGGAGCAGGAAGAGGA	60
	R: CCCCAAAAAACAAAGAATAATA	60
<i>Hyg pC1303</i>	F: CTATTCTTTGCCCTCGGACGA	55
	R: AAGTGCTTGACATTGGGGGAGTT	55
pCSA110	F: ATTGATGAAACTGCTGCTGT	58
	R: GGTGATACATATCCAGCCAT	58
<i>VviAG</i>	F: AGTCACCTTCTGTAAGCGCC	60
	R: GTTTGGTCGTGGCGAGAGTA	60
<i>VviAMS</i>	F: GGGTATGATGTTAATTGCAGGAG	60
	R: CTGGAATCAGGAGCCCAGTC	60
<i>VviAPI</i>	F: CAAGAGGAGGACTGGGTTGC	60
	R: CTGCTCCCAATGTGTCTGCT	60

<i>VviAP3</i>	F: AGGCAGGTCACCTACTCCAA R: GGGCAAATACCGGAGAGCTT	60 60
<i>VviBAM1</i>	F: CTTGGTTCCGGGTA CTGGTC R: AGCAAACAAGCAGCCCAATG	60 60
<i>VviCDKA;1</i>	F: CTGCTTGGATCACGCCACTA R: AATCTCCGAGTCCCCAGGAA	60 60
<i>VviDYT1</i>	F: GCGGGCATTAGTCCCTATCA R: TGGTTTCGCTCCTCTGCTTT	60 60
<i>VviE2FA</i>	F: TCACCTCCCCTTCACGTCTA R: GAGCATCGGCAGACGAAAAC	60 60
<i>VviEMS1</i>	F: TCCATTGCCGGAGCAAATCT R: TGACAGCATTGGGAGCTCTG	60 60
<i>VviFBL17</i>	F: TAACTGTGGCAGGTGTGGTC R: GCAGGTGCGTATATTGCTGC	60 60
<i>VviGAPDH</i>	F: TTCCGTGTTCTACTGTTGATGTG R: CCTCTGACTCCTCCTTGATGGC	58 58
<i>VviMYB80</i>	F: TTGAAACGAAGGCGATGGA R: TCCCATAGGACGCAGTCTGA	60 60
<i>VviMYB33</i>	F: AGGACCCATTGCCTTTTGCT R: TGTCCCAGATGGTGGAGACT	60 60
<i>VviMS1</i>	F: CCTTCCGTGAAAATGTGGCG R: ATGCTCCTCTCACCCCTCCT	60 60
<i>VviPI</i>	F: AACTCAAGCAACAGGCAGGT R: GCCAATCTCAAGGGCATCCT	60 60
<i>VviPSZ3</i>	F: ATGCCCAGTCTGCTTCC R: GCTGAGCCTGAGATGTGG	60 60
<i>VviSEP1</i>	F: TTTGTGATGCTGAGGTCGCT R: TGAGACTGAGCTTGCTGGTG	60 60
<i>VviSEP3</i>	F: TGGGGAGAGGTAGGGTTGAG R: TCGGGCTGGTATCCGATTTG	60 60
<i>VviSERK1</i>	F: CTCCACCTCCCCCATTTGTC R: AGCCACAAGAGAACCATCCG	60 60

Obs: F, *forward*; R, *reverse*.

4.3 Selección de plantas transgénicas y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Plantas de *Arabidopsis Atzat4* (+/-) y *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* fueron seleccionadas por aplicación de 120 mg/mL de herbicida BASTA® 14 SL (Bayer, Frankfurt, Alemania) y Silwet L-77 (Momentive Performance Materials Inc., Waterford, USA) Se realizaron tres aplicaciones cada dos días, por asperjado. Además, se aplicó el herbicida a plantas Col-0 como control.

Plántulas de *N. tabacum* cv. Xanthi generación T1 fueron seleccionadas en medio de cultivo MS con vitaminas Gamborg (Phytotechnology laboratories, Lenexa, USA), suplementado con higromicina.

Para la extracción de ADN genómico (ADNg) de tabaco se utilizó Genomic DNA Mini Kit (Plant) (Maestrogen, Nevada, USA) a partir de hojas, utilizando el protocolo del fabricante. Para *Arabidopsis* se utilizó el método de aislamiento por buffer de extracción a partir de hojas: Tris-HCl 200 mM (pH 7.5), NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0,5% (Kasajima et al., 2004). Para la selección por PCR de las plantas de *A. thaliana* se utilizaron partidores específicos para las regiones codificante de los genes *Atzat4* y *VviPSZ3*, además de partidores específicos para el T-DNA en las mutantes insercionales. Por otra parte, para las plántulas de tabaco se realizó PCR con partidores específicos al gen de resistencia a higromicina del vector pCAMBIA1303 (**Tabla 1**). En cada reacción de PCR se emplearon 25 ng totales de ADNg a partir de hojas, 1,5 mM de MgCl₂, 1X de buffer PCR, 250 nM de cada partidor, 200 nM dNTPs y 0,25 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI, USA). Las condiciones de PCR fueron: 94 °C por 10 min, 35 ciclos de 94 °C por 45s, 55-60 °C por 45s, 72 °C por 1-2 min y 30s, seguido de una extensión final de 72 °C por 7min.

4.4 Análisis de la expresión relativa.

4.4.1 Extracción de ARN.

ARN total fue extraído a partir de inflorescencias de vid en pre-antesis, y usado para el análisis de la expresión de genes implicados en la red de regulación del desarrollo del polen. Se utilizó el sistema *Spectrum™ Plant Total RNA* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. La calidad e integridad del ARN fue verificado por electroforesis en gel de agarosa y en base a la relación de absorbancia (260/280) de 1,9-2,0. La cuantificación de la concentración y absorbancia fue determinada mediante el equipo *Infinite® 200 PRO NanoQuant* (Tecan, Männedorf, Suiza).

Para el análisis de RNA-seq se extrajo ARN total a partir de botones florales, en estadio 12 del desarrollo de la flor de *Arabidopsis* (Smyth et al., 1990; Cardarelli and Cecchetti, 2014). Al igual que para las inflorescencias de vid, se utilizó el sistema *Spectrum™ Plant Total RNA* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), de acuerdo al protocolo del fabricante. La cuantificación de la concentración y absorbancia fue determinada mediante el *Infinite® 200 PRO NanoQuant*. El análisis de la calidad de las muestras fue realizado en el equipo *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, USA). Para todas las muestras de ARN se utilizaron tres réplicas biológicas obtenidas de tres plantas diferentes.

4.4.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc).

Previo a la síntesis de ADNc, y con el propósito de remover el ADNg contaminante, se realizó un tratamiento con DNasa Turbo™ (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) a todas las muestras de ARN aisladas, usando el protocolo del fabricante. Luego, la síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando el sistema *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL, conteniendo: 10 µl de RNA (1-2 µg), 1 µL oligo (dT), 4 µL buffer de reacción (5X), 1 µL de Inhibidor de ribonucleasa *RiboLock*, 2 µL de 10 mM dNTPs y 2 µL de transcriptasa reversa *M-MuLV*. La reacción utilizó los siguientes parámetros: 37 °C por 60 min de incubación y 70 °C por 5 min para detener la reacción.

4.4.3 Análisis de la expresión génica.

El análisis de expresión génica relativa fue realizado por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), utilizando un termociclador *Mx3000P QPCR System* (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, USA). Las amplificaciones del ADNc se realizaron utilizando el método de SYBR green, en un volumen final de 20 µL. El volumen final contenía 2 µL de ADNc (25 ng/µL), 10 µL del reactivo *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 0,5 µL de cada uno de los partidores específicos (**Tabla 1**), a una concentración de 0,25µM, y agua ultra pura. Para cada replica biológica se utilizaron tres replicas técnicas y se usó como control negativo agua ultra pura. Las condiciones de qPCR fueron 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 58-60 °C por 20 s y 72 °C por 20 s. Al término de cada etapa de amplificación se midió la fluorescencia y al final de la amplificación se generó una curva de disociación a través de la lectura continua de la fluorescencia durante el incremento de temperatura de 55 °C a 95 °C.

La expresión relativa de los genes de vid fue normalizada por la expresión del gen de la Glicer aldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *V. vinifera* (*VviGAPDH*). Este gen previamente se había descrito como un buen normalizador durante el desarrollo de las bayas en la vid (Reid et al., 2006), y análisis experimentales, demostraron que era un buen normalizador para el análisis de expresión en el desarrollo de la inflorescencia, manteniendo los niveles de expresión

constante en los estadios evaluados. El análisis de la expresión relativa se realizó manualmente utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

4.5 Análisis de la temporalidad del desarrollo de anteras y polen en la vid.

4.5.1 Caracterización fenológica.

Se colectaron muestras de inflorescencias de vides de diferentes tamaños (2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, y 10 cm) de la temporada 2018-2019 (octubre-noviembre de 2018), desde cuartos de la Viña Casa Silva, hacienda Los Lingues en San Fernando, Región del Libertador Bernardo O'higgins, Chile (34°32'18.3"S 70°58'00.6"W). Las inflorescencias se fijaron en solución Carnoy. Se realizó la caracterización fenológica de acuerdo a dos parámetros descritos en el sistema Eichhorn and Lorenz (E-L) (1977) modificado por (Coombe, 1995): largo del brote y número de hojas separadas. Estas características, se utilizaron para las inflorescencias en los estadios del desarrollo descritos en el sistema E-L. Se cuantificaron 20 plantas diferentes de manera aleatoria, de un cultivo clonal de *V. vinifera* cv. Carménère, para cada estadio utilizado en esta tesis.

4.5.2 Microscopía.

Las inflorescencias de diferentes tamaños, y clasificadas en sistema E-L, fueron fijadas y desteñidas en etanol absoluto-ácido acético (3:1). Luego, se tomaron flores individuales, las cuales fueron diseccionadas para obtener las anteras completas, las cuales fueron vaciadas sobre un portaobjeto y analizadas bajo lupa (Olympus SZ30; Tokio, Japón).

Las microsporas en desarrollo y los granos de polen fueron teñidos con orceína-acética y visualizadas bajo un microscopio óptico (Wild Leitz GMBH; Heerbrugg, Suiza), identificando los estadios del desarrollo de la inflorescencia en que estaría llevándose a cabo el desarrollo del polen. Luego, en aquellas etapas identificadas en el desarrollo del polen (estadio de PMCs, tétradas y grano de polen), nuevamente se realizó la disección y vaciado de anteras sobre un portaobjeto, para luego realizar tinción con solución 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Park

et al., 1998) de la línea germinal masculina en los distintos estadios del desarrollo. Por otra parte, los granos de polen fueron incubados con solución DAPI a 60 °C por 1 h en oscuridad. La solución DAPI consistió en 1 µL de DAPI (1mg mL⁻¹), 40 µL de EDTA (25 mM), 1 µL de Tritón X-100 y 958 µL de buffer fosfato (0,1 M, pH 7,0) (Huang et al., 2013). El gametofito masculino fue visualizado en etapas de la microsporogénesis, bajo un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX43; Tokio, Japón) acoplado a colimador (CoolLED pE-2; Andover, UK). Los estadios de PMCs y grano de polen fueron visualizados bajo un microscopio confocal Zeiss LSM780 (Oberkochen, Alemania). En los mismos estadios se evaluaron los genes del desarrollo del polen descritos en el ítem 5.2 de la metodología (**Tabla 1**).

4.6 Caracterización fenotípica del mutante *Atzat4* (+/-).

4.6.1 Viabilidad del polen.

Para el análisis de la viabilidad del grano de polen se realizó el método de tinción en solución de Alexander modificada (Peterson et al., 2010). Flores de *Arabidopsis* de tipo silvestre (WT; Col-0) y mutantes *Atzat4* (+/-), en estadio 12 del desarrollo de la flor (Smyth et al., 1990; Cardarelli and Cecchetti, 2014), fueron diseccionadas bajo lupa (Olympus SZ30; Tokio, Japón) para la obtención de estambres completos, los cuales fueron fijados y desteñidos en solución Carnoy. Esta solución consiste de etanol absoluto, cloroformo y ácido acético, en proporción de 6:3:1. Los estambres fueron mantenidos en la solución por al menos dos horas. Los estambres ya fijados se colocaron sobre portaobjeto y se le agregó 2-4 gotas de solución Alexander modificada. Esta solución contiene para 100 mL, 10 mL de etanol absoluto, 1 mL de verde Malaquita, 50 mL de agua destilada, 25 mL de glicerol, 5 mL de fucsina ácida, 0,5 mL de anaranjado G, y 4 mL de ácido acético glacial. Se completa el volumen con agua destilada (Peterson et al., 2010). Inmediatamente colocada la solución, la muestra fue cubierta con un cubreobjeto y calentada en mechero por aproximadamente 30 s. Posteriormente, la tinción fue visualizada bajo microscopio óptico (Wild Leitz GMBH; Heerbrugg, Suiza). Los granos de polen viables fueron aquellos que mostraron tinción roja, producida por la tinción de los citoplasmas. Por otra parte, los granos de polen inviable fueron aquellos para los que no se

observó tinción roja y solo se observó la pared teñida verde. Luego, el número de granos de polen viables de las anteras fue cuantificado (100 granos de polen), a partir de flores de cuatro plantas diferentes (réplicas biológicas), sacando así el porcentaje de viabilidad para cada genotipo.

4.6.2 Germinación y elongación del tubo polínico *in vitro*.

Para el análisis de la germinación y elongación del tubo polínico se utilizaron cuatro anteras dehiscentes (anthesis) de tres plantas diferentes de *Arabidopsis* (réplicas biológicas), incluyendo los genotipos WT, *Atzat4* (+/-) y *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*. Los granos de polen de cada flor fueron depositados sobre portaobjetos con medio de germinación sólido. El medio consistió de 200 μ L de KCl 500 mM, 200 μ L de CaCl₂ 500 mM, 200 μ L de MgSO₄ 100 mM, 200 μ L de H₃BO₃ al 1%, 4 g de sacarosa y 0,3 g de agarosa (1,5%), considerando un volumen final de 20 mL de solución a pH 7,5. Las muestras se cubrieron con membrana de diálisis y fueron dispuestas en cámara húmeda por 6 h a 28 °C. Se visualizó la germinación y elongación bajo microscopio (Zeiss LSM700; Oberkochen, Alemania). Finalmente, se realizó la cuantificación de 300 granos de polen. Los granos de polen germinados y la medición de la longitud de los tubos polínicos utilizando el software ImageJ (National Institute of Health, USA). Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de germinación de los granos de polen y un promedio del tamaño de los tubos polínicos.

4.6.3 Cuantificación del número de semillas por silicuas y tamaño de la silicua.

Se realizó decoloración de silicuas maduras, no dehiscentes, para las plantas WT, *Atzat4* (+/-) y *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*. La solución de decoloración contenía etanol, ácido acético y glicerol (en proporción 3:1:1 v/v) y se incubó a 90 °C por 15 min. La cuantificación de las semillas se realizó bajo lupa (Olympus SZ30; Tokio, Japón). Se cuantificaron semillas de 10 silicuas de tres plantas diferentes. Además, se realizó la cuantificación del tamaño de 12 silicuas de tres plantas diferentes, para los tres genotipos. Al igual que para el número de semillas, las silicuas eran maduras, no dehiscentes.

4.6.4 Viabilidad y germinación de semillas.

El análisis de la viabilidad de las semillas se realizó utilizando el test de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio; TZ) para los genotipos Col-0 (WT), *Atzat4* (+/-) y *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*. El TZ precipita a 2,3,5-trifenil-formazán de color rojo por la actividad de las deshidrogenasas presentes en las células vivas (Porter et al., 1946; Verma et al., 2013; Verma and Majee, 2013). Se tomaron 100 semillas en tres réplicas técnicas, las cuales fueron escarificadas con solución que contenía 20 mL de cloro comercial y 100 µL de tritón X-100, en 100 mL de agua destilada estéril, y se incubaron en agitación por 15 min. Luego, las semillas se lavaron 5 veces con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas fueron incubadas con solución TZ al 1%, a 30 °C, entre 24-48 h, en oscuridad. Como control negativo, 100 semillas fueron incubadas a 100 °C por 1 h. Luego, las semillas se lavaron con agua destilada estéril 3 veces y se les agregó solución clarificante (lactofenol). Ésta consistió en ácido láctico, fenol, glicerol y agua, en proporción 1:1:2:1 v/v. Finalmente, se realizó cuantificación de las semillas viables, inviables y defectuosas, bajo lupa (Olympus SZ30; Tokio, Japón).

Paralelamente al análisis de viabilidad, un análisis de germinación de semillas de *Arabidopsis* fue realizado para los tres genotipos, utilizando un medio de cultivo MS, con vitaminas Gamborg (Phytotechnology laboratories, Lenexa, USA) y 3% p/v de sacarosa. Se utilizaron aproximadamente 50 semillas, en triplicado, las cuales fueron desinfectadas con etanol absoluto durante 1 min, hipoclorito de sodio comercial y Silwet-L77 (Momentive Performance Materials Inc., Waterford, USA) durante 45 s, y finalmente lavadas 5-6 veces con agua estéril, bajo cámara de flujo laminar. Posteriormente, las semillas fueron dispuestas en cámara de crecimiento y se cuantificaron las semillas germinadas al tercer día de crecimiento.

4.6.5 Cuantificación de las hojas por roseta.

El número de hojas por roseta fue cuantificado en plantas de *Arabidopsis* WT y *Atzat4* (+/-), de un mes y medio de edad, sin crecimiento reproductivo, y mantenidas en cámara de crecimiento. Para la cuantificación se utilizaron 15 plantas de cada genotipo.

4.7 Análisis de la actividad transcripcional de los promotores de *VviPSZ3* y *AtZAT4*.

La actividad *GUS* en tejidos florales de plantas transgénicas de *N. tabacum* cv. Xanthi, transformadas con el vector pCAMBIA1303, conteniendo las construcciones prom*VviPSZ3*::*GUS*; prom*AtZAT4*::*GUS*, fue analizada mediante tinción histoquímica. Los tejidos florales fueron sumergidos en una solución buffer que contenía 1 mM X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-ácido glucurónico en 50 mM de Na₂HPO₄, pH 7, 0,1% Tritón X-100, 0,1 mM K₃Fe (CN)₆). Las flores fueron incubadas en oscuridad a 37 °C por 48 h (Jefferson et al., 1987; Karcher, 2002). Luego, las muestras fueron tratadas con una solución de fijación (425 mL etanol absoluto, 425 mL agua destilada, 50 mL ácido acético glacial, 100 mL formalina 37%) por 15 min. Posteriormente, las muestras fueron decoloradas en una solución de metanol y acetona (3:1) para extraer la clorofila y otros pigmentos que puedan impedir la formación del compuesto cromogénico azul, producto de la actividad GUS sobre X-Gluc. Los resultados fueron registrados mediante fotografía digital.

4.8 RNA-seq y análisis bioinformático.

Se realizó RNA-seq de ARN total extraído de un *pool* de botones florales de cuatro réplicas biológicas, en estadio 12 del desarrollo floral de *A. thaliana* para los genotipos *Atzat4* (+/-), prom35S::*VviPSZ3/Atzat4* y WT. Se seleccionó el estadio 12 del desarrollo floral de *A. thaliana*, puesto que en él se obtienen granos de polen tricelular y la antera no se encuentra dehiscente (Smyth et al., 1990; Cardarelli and Cecchetti, 2014). La extracción del ARN se realizó utilizando *Spectrum*TM *Plant Total RNA* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. El control de calidad de las muestras se llevó a cabo en *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, USA), con un *RNA Integrity Number* (RIN) igual o mayor a 7,0.

La secuenciación fue realizada en Genoma Mayor, Universidad Mayor (Santiago, Chile). Las genotecas, obtenidas por sistema TruSeq Stranded mRNA LT Kit (Illumina; San Diego, USA) se secuenciaron utilizando Illumina HiSeq 3000 en modo *paired-end* de 150 pb.

Para el análisis bioinformático, las lecturas crudas fueron filtradas por calidad, utilizando el software Trim-Galore (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/), a través del cual se realizó la eliminación de las secuencias adaptadoras de la secuenciación Illumina, las secuencias de bases de mala calidad en los extremos de las secuencias (*prinseq option -q 25*) y de las lecturas de baja calidad, que en promedio tengan un valor *Phred* menor a 18. Los reportes de la calidad de las lecturas pre y post filtrado fueron generadas con el software FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Luego, las lecturas filtradas fueron ensambladas usando el software STAR 2.5.0 (Dobin et al., 2013), para lo cual se utilizó el genoma de referencia de *A. thaliana* (versión TAIR10; <https://gbrowse.arabidopsis.org/cgi-bin/gb2/gbrowse/arabidopsis/>) y la herramienta *sort* del software Samtools (Li et al., 2009) (**Tabla S1**). Luego, se utilizó la herramienta HTSeq-count (Anders et al., 2015) para cuantificar las lecturas mapeadas en relación a la anotación del genoma indexado. Finalmente, se utilizó DESeq2 (Love et al., 2014) para determinar la expresión diferencial de los genes en relación a los genotipos estudiados. Esto se realiza testeando la probabilidad de que el $\log_2 \text{fold change}$ ($\log_2\text{FC}$) sea significativamente distinto a 0. La expresión diferencial se consideró significativa con un *p-value* < 0,05. Se obtuvo tres comparaciones: *Atzat4* (+/-) vs. WT, *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* vs. *Atzat4* (+/-), y *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* vs. WT.

Con el resultado de los genes expresados diferencialmente, se realizó un análisis de ontología genética (*GO, Gene Ontology*), para identificar los genes que participaran en el desarrollo reproductivo, en el desarrollo de polen, y en el desarrollo del embrión y las semillas en *Arabidopsis*. Para esto se utilizó agriGO v2.0, con la base de datos de *A. thaliana* (TAIR 10) en la categoría de procesos biológicos y con los parámetros estadísticos por defecto (Tian et al., 2017). Los genes fueron agrupados en aquellos que eran regulados negativamente y los regulados positivamente, de acuerdo al $\log_2\text{FC}$. Con los términos del GO significativos (*adjusted p-value* $\leq 0,05$), se realizó la reducción de términos redundantes utilizando REVIGO (Supek et al., 2011) y se obtuvo gráficamente los resultados en base al *p-value*. Esto permitió filtrar de la lista de genes diferencialmente expresados obtenidos en el RNA-seq.

Luego, se analizó la función de los genes de acuerdo a lo descrito en las bases de datos de TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), seleccionado

aquellos que estuviesen involucrados en el desarrollo reproductivo. Para graficar los genes seleccionados, expresados diferencialmente en *Atzat4* (+/-), *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* y el WT, y que estuviesen involucrados en procesos reproductivos, se analizó el \log_2FC y se seleccionaron en base a este parámetro, el cual debía ser significativo ($p\text{-value} < 0,05$), para al menos una comparación de genotipos. Los resultados fueron representados gráficamente en un *heat map*, el cual fue realizado en el software Pheatmap_1.0.12 en interfaz R versión 3.5.2. Además, en el *heat map* se graficaron genes que mostraron una expresión diferencial significativa, y que estuviesen involucrados en otros procesos biológicos de *Arabidopsis*.

4.9 Análisis estadístico.

El análisis estadístico de la caracterización fenotípica (descrito en ítem 4.6) del mutante *Atzat4* (+/-) comparado con el WT fue realizado en el software GraphPad Prism 6.01, a través de un análisis de T-test (T de student) ($\alpha < 0.05$). De igual forma, se realizó el análisis estadístico para la caracterización fenotípica de las plantas transgénicas *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* comparadas con el WT.

Por otro lado, para evaluar estadísticamente los análisis de expresión génica por q-PCR, se realizó ANOVA de un factor y comparación de medias por test Tukey ($p < 0.05$). Así se comparó los niveles de expresión relativa de los genes evaluados (descrito en ítem 4.4), entre los diferentes estadios del desarrollo de la inflorescencia de la vid (E12-E19). Para este análisis, se utilizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Primero se determinó que la distribución de los datos de expresión relativa fuera normal. Aquellas variables sin distribución normal fueron transformadas mediante \log_{10} o raíz cuadrada de la expresión relativa, para obtener la normalidad. Para esto, se utilizó la interfaz de R commander versión 2.5-0 (Fox, 2005).

V RESULTADOS

5. 1 El desarrollo del polen se posiciona entre los estadios 13 y 15 del sistema E-L.

5.1.1 Fenología del desarrollo de la inflorescencia en *V. vinifera* cv. Carménère.

Para posicionar el desarrollo del polen en la vid cv. Carménère, primero se establecieron los estadios fenológicos del desarrollo de la inflorescencia, de acuerdo al sistema descrito por Eichhorn and Lorenz (E-L) (1977) y modificado por (Coombe, 1995). Este sistema, se basa en caracteres morfológicos y determina un estadio del desarrollo, en relación al número de hojas separadas y a la longitud del brote (Coombe, 1995) (**Tabla 2**). Para posicionar los estadios fenológicos en escala E-L, se midió el tamaño de las inflorescencias pre-antesis y se cuantificaron los caracteres morfológicos señalados. De acuerdo a la caracterización fenológica del desarrollo de la vid Carménère, las inflorescencias pre-antesis de vid se posicionaban entre los estadios 12 y 19 del sistema E-L (**Figura 4**).

Tabla 2. Fenología de la inflorescencia en *Vitis vinifera* cv. Carménère. Estadios del desarrollo de la inflorescencia de la vid fueron determinados de acuerdo a sistema Eichhorn and Lorenz (1977) modificado por (Coombe, 1995).

Estadio E-L	Tamaño de la inflorescencia (cm)	Largo de brote (cm)*	Número de hojas separadas*
12	2	13,1 ± 0,3	5,9 ± 0,1
13	3	19 ± 0,9	7,3 ± 0,2
14	4	26 ± 1,1	8,9 ± 0,2
15	6	40,9 ± 1,9	10,2 ± 0,2
16	7	39,8 ± 2,2	9,9 ± 0,2
17	8	46,3 ± 3	10,4 ± 0,2
18	9	48,5 ± 3,6	12,1 ± 0,2
19	10	56,6 ± 3,4	12,5 ± 0,3

* Los valores representan la media de 20 réplicas biológicas ± SE.

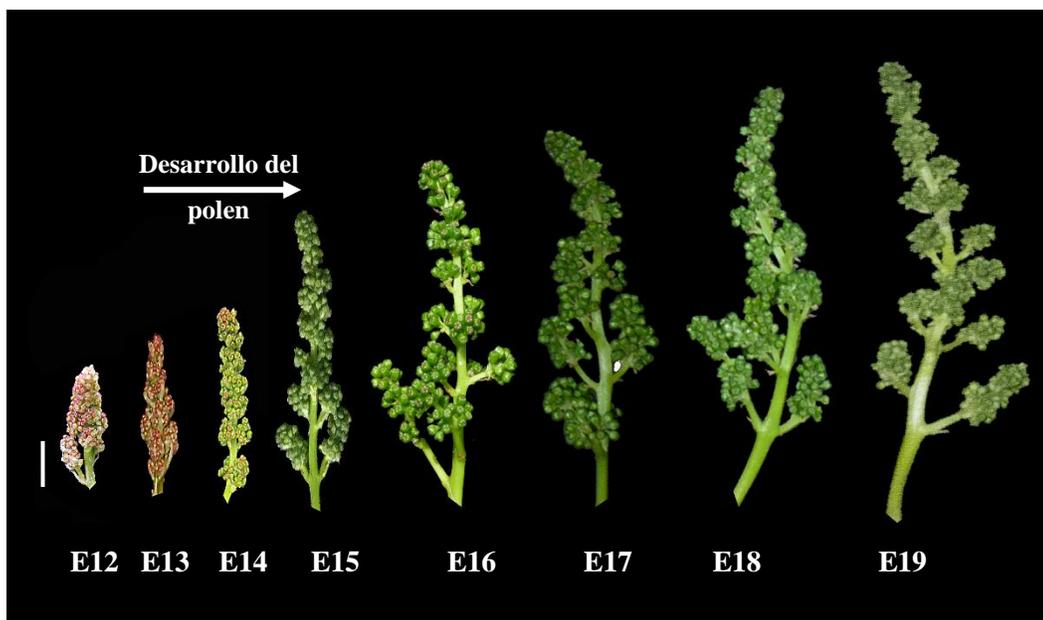


Figura 4. Desarrollo de la inflorescencia en *Vitis vinifera* cv. Carménère. Estadios fenológicos de la inflorescencia desde E12 a E19 en sistema Eichhorn and Lorenz (1977) modificado por (Coombe, 1995). **E12:** Inflorescencia de 2 cm; **E13:** inflorescencia de 3 cm; **E14:** inflorescencia de 4 cm; **E15:** inflorescencia de 6 cm; **E16:** inflorescencia de 7 cm; **E17:** inflorescencia de 8 cm; **E18:** inflorescencia de 9 cm; **E19:** inflorescencia de 10 cm. Barra = 1 cm.

En base a los estadios del desarrollo identificados, luego, se realizó la búsqueda de la temporalidad del desarrollo del polen en la vid cv. Carménère. Para esto, se disectaron las anteras de inflorescencias individuales, luego se vació el contenido de las anteras (línea germinal masculina), y finalmente se realizó tinción con orceína acética. Inmediatamente, bajo microscopía óptica se visualizaron los distintos preparados. Los resultados de las tinciones mostraron que el desarrollo del polen: desde PMCs, pasando por microsporogénesis y terminando con granos de polen bicelulares, estaría posicionado entre los estadios 13 y 15 en el sistema E-L, es decir entre inflorescencias de 3 cm y 6 cm, respectivamente. El desarrollo de la inflorescencia ocurre asincrónicamente, por esta razón dentro de una misma inflorescencia, se observaron flores cuyas anteras se encontraban en distintos estadios del desarrollo del polen (**Figura 4**). En el ápice de las inflorescencias en el estadio 14 del sistema E-L (4 cm) se identificaron microsporocitos (PMCs). Por otra parte, en la base del mismo estadio se identificó el estadio de tétrada. Por otro lado, en el estadio 15 del sistema E-L se identificaron granos de

polen (**Figuras 5A-5C**). Con la identificación de la temporalidad del desarrollo del grano de polen se realizó el análisis de las fases de la microsporogénesis, pudiéndose observar diversas fases de meiosis I y meiosis II en base a la organización de los cromosomas meióticos, utilizando tinción DAPI (**Figuras 5E-5J**) (Pereira et al., 2014). Además de las diferentes etapas de meiosis, se identificó PMCs (**Figura 5D**), tétradas (**Figura 5J**) y granos de polen en estadio bicelular (**Figura 5K**), dentro de los estadios previamente establecidos, 13 y 15 en sistema E-L, donde estaría ocurriendo el desarrollo del polen.

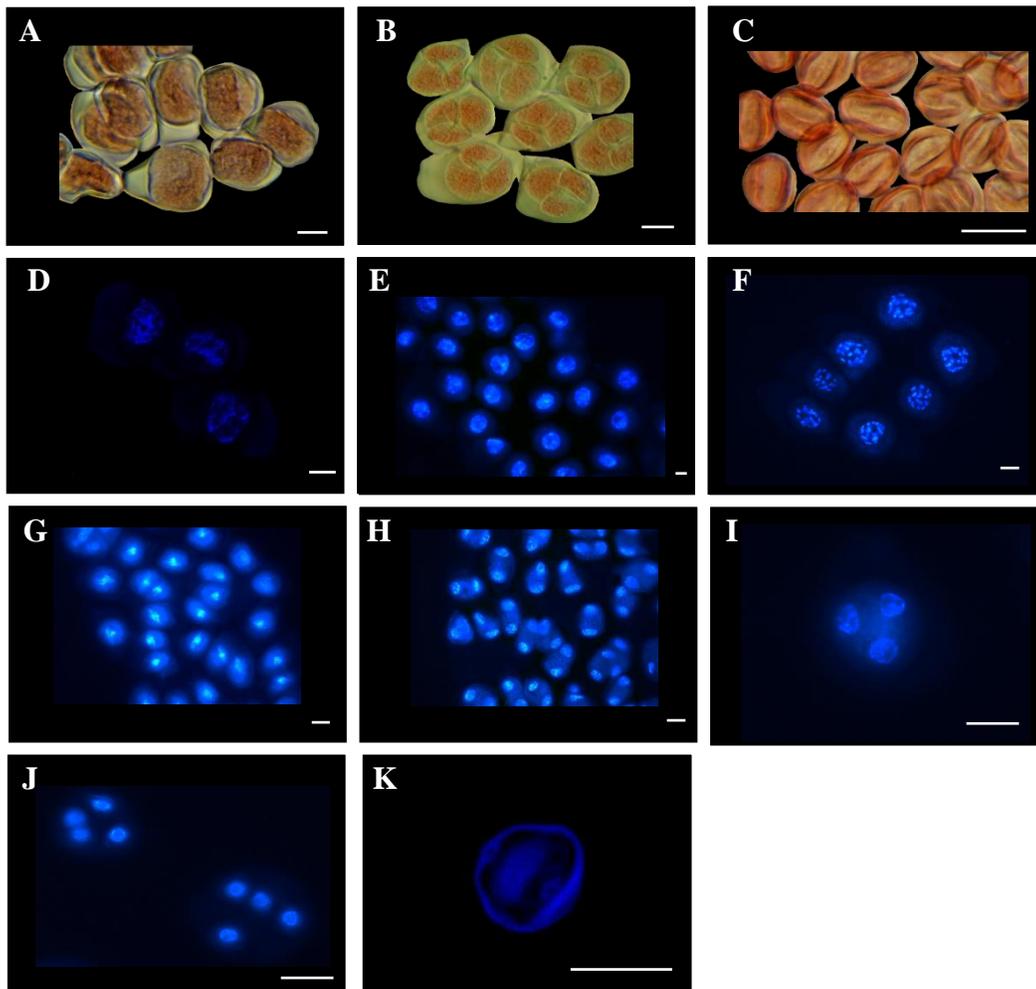


Figura 5. Desarrollo del grano de polen en *Vitis vinifera* cv. Carménère. (A-C) Imágenes a microscopio óptico (400X) de tinciones con orceína acética. **A.** Microsporocitos (Células Madres del Polen, PMCs), identificadas en estadio 14 (ápice de la inflorescencia). **B.** Tétradas identificadas en estadio 14 (base de la inflorescencia). **C.** Granos de polen, identificados en estadio 15 (base de la inflorescencia) (D-K) Imágenes bajo microscopio de fluorescencia (1000X) y microscopio confocal (630X) de tinción DAPI. **D.** Microsporocitos **E.** Profase I; **F.** Profase I; **G.** Profase I; **H.** Profase I; **I.** Profase I; **J.** Tétrada; **K.** Grano de polen bicelular.

Cigoteno. **F.** Profase I; Diacinesis. **G.** Metafase I. **H.** Telofase I. **I.** Anafase II. **J.** Tétrada. **K.** Grano de polen. Barras: PMCs, fases de la meiosis y tétradas = 10 μm ; polen = 20 μm .

5.1.2 Análisis de la expresión de genes involucrados en el desarrollo floral, de la antera y del grano de polen en *V. vinifera* cv. Carménère.

Identificadas las etapas del desarrollo del grano de polen en la vid cv. Carménère, se realizó la búsqueda en el genoma de la vid de los genes homólogos a los genes de identidad de órganos florales (sistema ABCE) de *Arabidopsis*. Los resultados de expresión relativa mostraron un patrón de expresión diferencial en los diferentes estadios evaluados. *VviAPI* presentó un máximo de expresión en el estadio 12 (9,4 veces) y bajó gradualmente en los siguientes estadios. *VviPI* en cambio, reveló una tendencia diferente, donde la expresión de este gen aumentó gradualmente a partir del estadio 12, alcanzando el máximo de expresión en el estadio 16, con un aumento de 2,5 veces, para luego bajar gradualmente en los estadios posteriores del sistema E-L. La expresión de *VviAP3* aumentó gradualmente a partir del estadio 12 (3,8 veces), alcanzando un máximo de expresión en el estadio 14 (7,4 veces), para luego bajar gradualmente en los siguientes estadios del sistema E-L. *VviAG* mostró una tendencia similar a *VviPI*, aumentando gradualmente a partir del estadio 12, alcanzando un máximo de expresión en el estadio 16 (5,3 veces). Luego, la expresión cayó drásticamente en los siguientes estadios del desarrollo. Por su parte *VviSEPI* y *VviSEP3* presentaron una expresión relativamente constante entre los estadios 12 y 15. Sin embargo, la expresión de *VviSEPI* fue relativamente baja, con un máximo de expresión de 1,3 veces, y cayó drásticamente a partir del estadio 16. En cambio, *VviSEP3* mostró un máximo de expresión en el estadio 16 (6,6 veces), para luego bajar en los siguientes estadios del desarrollo de la vid Carménère (**Figura 6**).

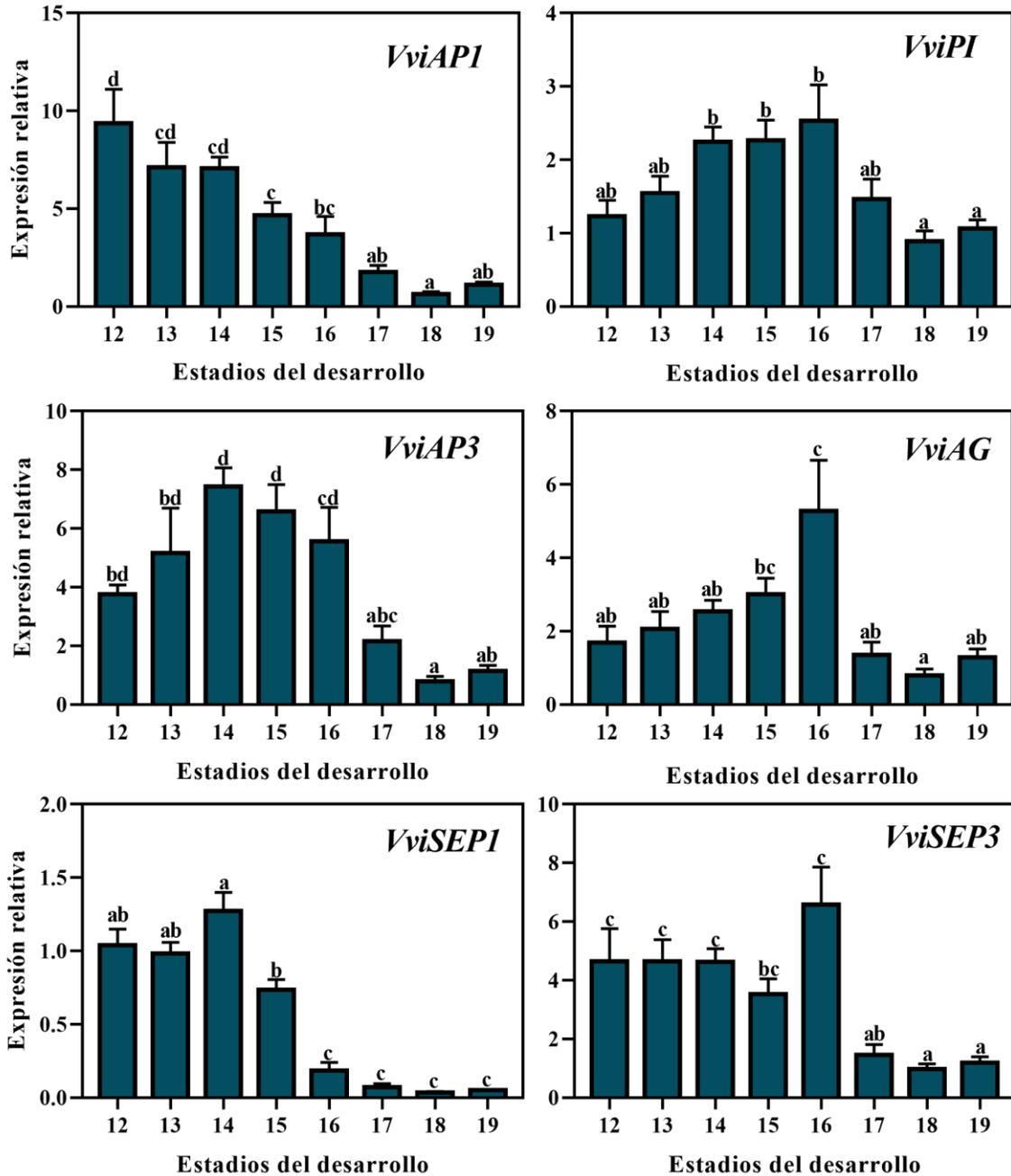


Figura 6. Perfiles de expresión de genes que codifican para factores de transcripción del tipo MADS-box en *Vitis vinifera* cv. Carménère. Expresión relativa de genes implicados en la identidad de órganos florales en diferentes estadios del desarrollo de la inflorescencia de la vid, de acuerdo al sistema de Eichhorn y Lorenz 1977, modificado por (Coombe, 1995). La expresión relativa fue normalizada contra los niveles de transcritos de *VviGAPDH*. Todos los puntos representan el promedio de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas \pm SE. **12-19:** estadios del desarrollo en sistema E-L. Las diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) se muestran con letras diferentes.

Los genes *EMS1*, *SERK1* y *BAM1* se han descrito como participantes de la especificación de la antera en *Arabidopsis* (Canales et al., 2002; Zhao et al., 2002; Albrecht et al., 2005; Hord et al., 2006). En este trabajo, estos genes presentes en la vid cv. Carménère, fueron nombrados como “*Genes de la especificación de las anteras (GEA)*”. Los resultados mostraron patrones de perfiles transcripcionales diferenciales, así los genes *VviEMS1* y *VviSERK1* presentaron un máximo de expresión en estadios tempranos, con un máximo de expresión de 14 y 16 veces, respectivamente, entre los estadios 12 y 13. Pero también mostraron un comportamiento diferente en los siguientes estadios, ya que para *VviEMS1* la reducción de la expresión fue abrupta (estadios 14-19) y para *VviSERK1* fue gradual para los mismos estadios (**Figura 7**). Una situación completamente diferente a los genes anteriores, lo presentó *VviBAM1* el cual mantuvo un alto nivel de expresión desde el estadio 12 al 17 (entre 5-6 veces) para luego reducir sustancialmente su expresión en los estadios 18 y 19.

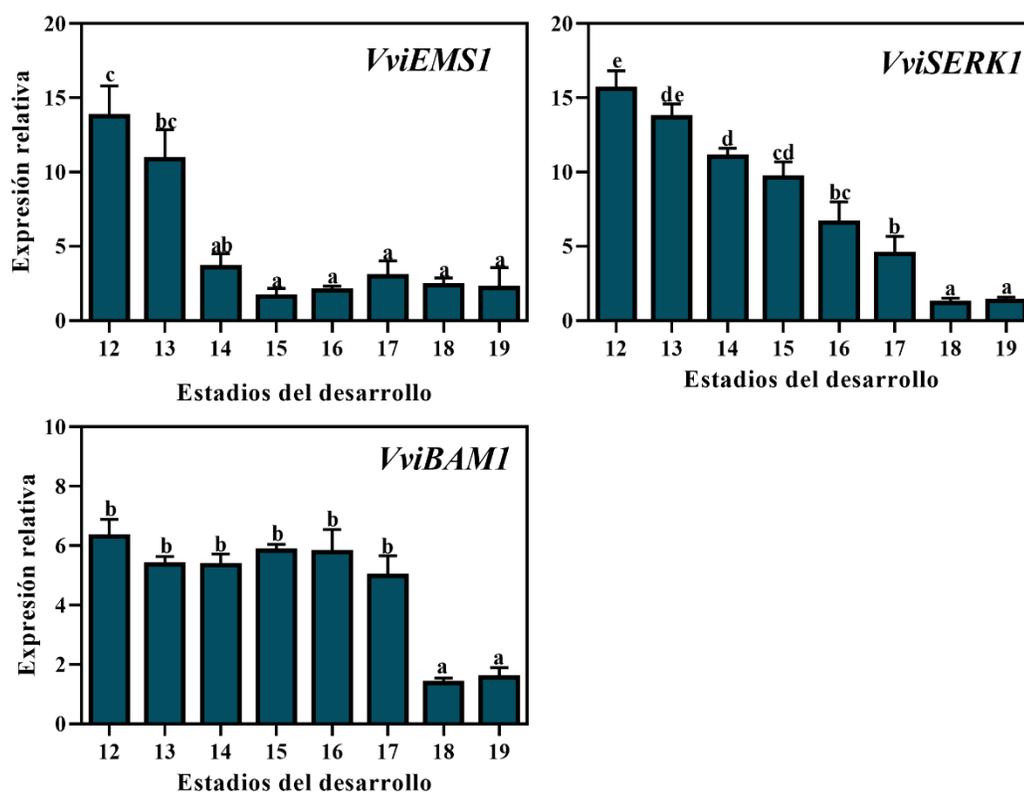


Figura 7. Perfiles de expresión de genes involucrados en el desarrollo de la antera en *Vitis vinifera* cv. Carménère. Expresión de genes descritos en la red regulatoria de la especificación de la antera en *Arabidopsis*, en diferentes estadios del desarrollo de la inflorescencia de la vid, de acuerdo al sistema de Eichhorn y Lorenz 1977 modificado por (Coombe, 1995). La expresión

relativa fue normalizada contra los niveles de transcritos de *VviGAPDH*. Todos los puntos representan el promedio de tres replicas biológicas y tres réplicas técnicas \pm SE. **12-19**: estadios del desarrollo en sistema E-L. Las diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) se muestran con letras diferentes.

Los genes *DYT1*, *MYB33*, *MS1*, *MYB80* y *AMS*, están involucrados en el desarrollo del grano de polen en *Arabidopsis* (Sorensen et al., 2003; Millar and Gubler, 2005; Vizcay-Barrena and Wilson, 2006; Zhang et al., 2006; Yang et al., 2007; Zhang et al., 2007). En este trabajo estos genes presentes en la vid cv. Carménère, fueron nombrados como “*Genes de la formación del polen maduro (GPM)*”. En este grupo de genes, los perfiles de expresión evaluados mostraron una alta intensidad de expresión, entre los estadios del desarrollo de la inflorescencia en la vid cv. Carménère evaluados, a excepción de *VviMYB33* (**Figura 8**). También, para este grupo de genes, la expresión en los diferentes estadios evaluados fue diferencial. Los genes *VviDYT1* y *VviAMS* iniciaron su aumento en la expresión en el estadio 13 y alcanzaron su máxima expresión en el estadio 14, para luego reducir su expresión sustancialmente en los estadios 15 y 16, con un máximo de 254, 3 y 1232,2 veces, en el estadio 14, respectivamente, hasta llegar a desaparecer en los restantes estadios. En cambio, *VviMYB80* y *VviMS1* iniciaron su expresión en el estadio 14, alcanzando su máxima expresión en el estadio 15 de 715, 2 y 2038, 4 veces, respectivamente. En el caso de *VviMYB80* este nivel se mantuvo alto hasta el estadio 16, para luego descender paulatinamente en el resto de los estadios. En cambio, *VviMS1* mantuvo alto su nivel de expresión hasta el estadio 17, bajó fuertemente en el estadio 18 y desapareció en el siguiente estadio. Un patrón de expresión diferente mostró el gen *VviMYB33*, el que comenzó su aumento en la expresión en el estadio 14 y alcanzó su máximo nivel en el estadio 16 (4,7 veces), para luego disminuir paulatinamente hasta el estadio 19 del sistema E-L.

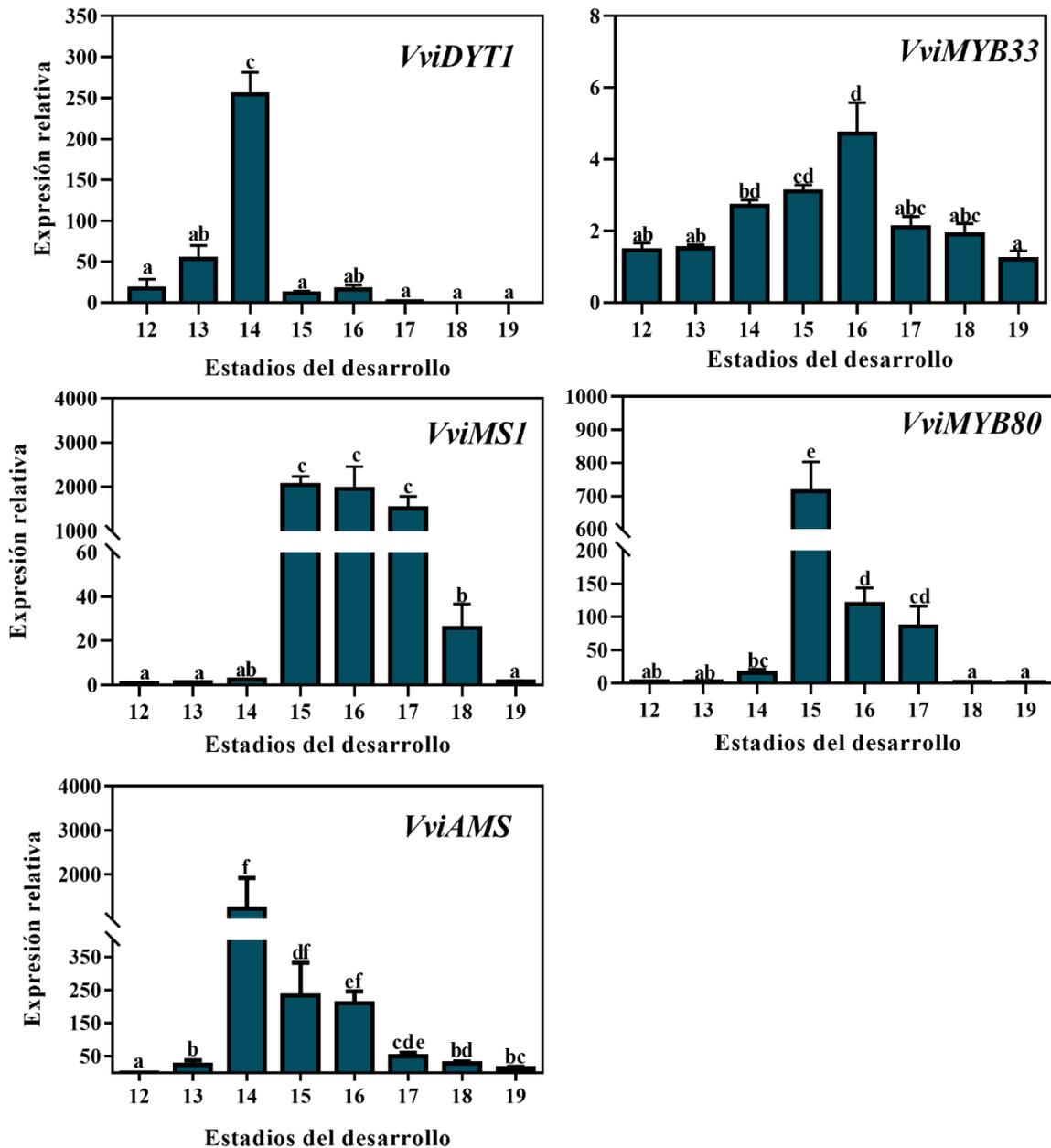


Figura 8. Perfiles de expresión de genes involucrados en el desarrollo del polen en *Vitis vinifera* cv. Carménère. Expresión de genes descritos en la red regulatoria del desarrollo y maduración del polen en *Arabidopsis*, en diferentes estadios del desarrollo de la inflorescencia de la vid, de acuerdo al sistema de Eichhorn y Lorenz 1977 modificado por (Coombe, 1995). La expresión relativa fue normalizada contra los niveles de transcritos de *VviGAPDH*. Todos los puntos representan el promedio de tres replicas biológicas y tres réplicas técnicas \pm SE. **12-19:** estadios del desarrollo en sistema E-L. Las diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) se muestran con letras diferentes.

Genes involucrados en la microgametogénesis (*VviFBL17*, *VviE2FA* y *VviCDKA;1*) también fueron evaluados por qPCR. En la **Figura 9** se puede observar que *VviFBL17* mostró un perfil de expresión temprana, entre los estadios 12 y 14, con un promedio de 25 veces, y luego la expresión bajó gradualmente. Por otra parte, el gen *VviE2FA* presentó un máximo de expresión tardío entre los estadios 16 y 17, con un promedio de 3,1 veces. Mientras que *VviCDKA;1* no mostró una tendencia concluyente en la expresión relativa.

Finalmente, también se evaluó la expresión de *VviPSZ3* en los diferentes estadios del desarrollo del sistema E-L. Este gen mostró un patrón de expresión dinámico entre los estadios evaluados. Se observó un aumento de expresión gradual a partir del estadio 12 alcanzando un punto de expresión mayor en el estadio 15 (3 veces). Luego, la expresión baja levemente en los estadios 16 y 17, para luego alcanzar el máximo de expresión en los estadios 18 y 19 (3,4 veces), manteniéndose constante en dichos estadios (**Figura 10**).

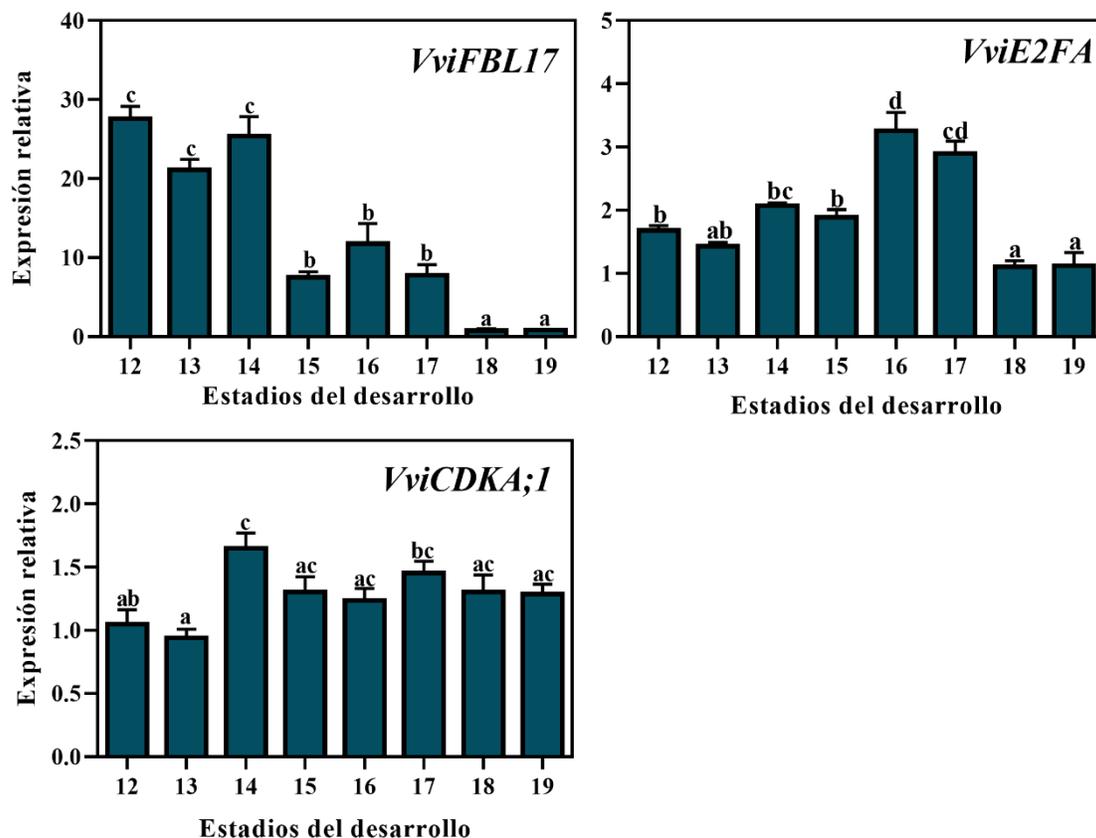


Figura 9. Perfiles de expresión de genes involucrados en la microgametogénesis del polen en *Vitis vinifera* cv. Carménère. Expresión de genes descritos en la microgametogénesis de *Arabidopsis*, en diferentes estadios del desarrollo de la inflorescencia de la vid, de acuerdo al

sistema de Eichhorn y Lorenz 1977 modificado por (Coombe, 1995). La expresión relativa fue normalizada contra los niveles de transcritos de *VviGAPDH*. Todos los puntos representan el promedio de tres replicas biológicas y tres réplicas técnicas \pm SE. **12-19**: estadios del desarrollo en sistema E-L. Las diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) se muestran con letras diferentes. Las diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) se muestran con letras diferentes.

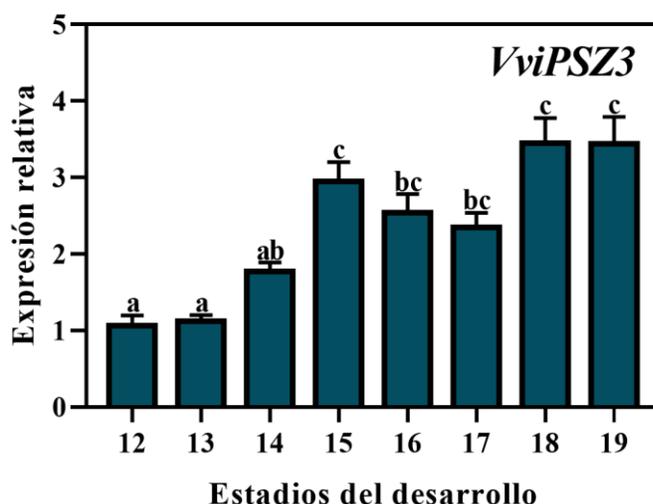


Figura 10. Perfil de expresión del gen *VviPSZ3*. Expresión relativa de *VviPSZ3* en diferentes estadios del desarrollo de la inflorescencia de la vid, de acuerdo al sistema de Eichhorn y Lorenz 1977 modificado por (Coombe, 1995). La expresión relativa fue normalizada contra los niveles de transcritos de *VviGAPDH*. Todos los puntos representan el promedio de tres replicas biológicas y tres réplicas técnicas \pm SE. **12-19**: estadios del desarrollo en sistema E-L. Las diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) se muestran con letras diferentes.

5.2 *Atzat4* (+/-) muestra defectos en la línea germinal masculina y en la fertilidad.

5.2.1 Viabilidad y germinación del grano de polen.

Se realizó la caracterización fenotípica del mutante insercional heterocigoto *Atzat4* (+/-) de *A. thaliana*, comparándolo con el ecotipo Col-0 (WT), ya que, *AtZAT4* aún no ha sido caracterizado funcionalmente y solo se encuentra anotado con una putativa función en estrés abiótico, al igual que otros miembros de la familia ZAT (Englbrecht et al., 2004). Se utilizaron dos réplicas biológicas (set de plantas diferentes) del mutante *Atzat4* (+/-), las cuales fueron representadas como *Atzat.1* y *Atzat.2*. Los primeros análisis estaban orientados a

determinar los defectos en la línea germinal masculina. Se determinó la viabilidad del grano de polen, a través de tinción Alexander modificada (Peterson et al., 2010). Los resultados de la cuantificación de los granos de polen viables, mostraron que no existieron diferencias significativas entre la viabilidad de los granos de polen de *Atzat4* (+/-) con el WT, mostrando en ambos casos una viabilidad cercana al 100% (**Figuras 11A y 11B**). Sin embargo, al cuantificar la germinación y elongación del tubo polínico *in vitro* se pudo observar diferencias significativas en el mutante *Atzat4* (+/-) comparado con el WT, donde *Atzat4* (+/-) presentó una reducida germinación y un menor tamaño de los tubos polínicos elongados. Los resultados indicaron que *Atzat4* (+/-) presentaba en promedio una germinación de un 34% y un 30% en *Atzat.1* y *Atzat.2*, respectivamente, en comparación con un 56% en el WT. Además, los granos de polen mostraron una elongación reducida, 164 μm y 230 μm en promedio en *Atzat.1* y *Atzat.2*, respectivamente, comparado con los 303 μm del WT (**Figuras 11C-11E**). Estos resultados sugieren defectos en la línea germinal masculina al presentar una actividad defectuosa de AtZAT4.

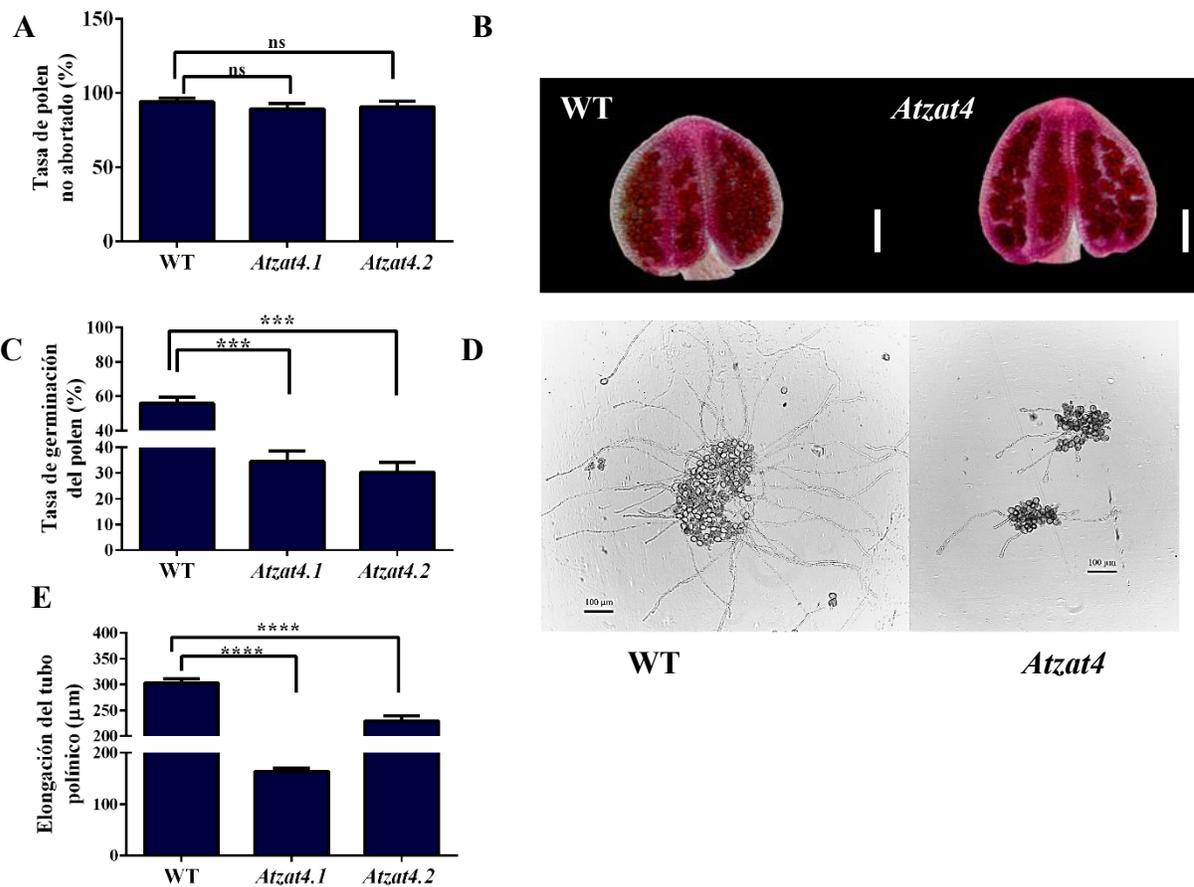


Figura 11. Línea germinal masculina del mutante *Atzat4* (+/-) comparada con el ecotipo Col-0 (WT) de *Arabidopsis thaliana*. (A-B) Tinción Alexander modificada (Peterson et al., 2010). **A.** Cuantificación de granos de polen viables. **B.** Tinción roja Alexander de granos de polen por antera; tinción roja muestra granos de polen viables. (C-E) Germinación de granos de polen y elongación del tubo polínico *in vitro*. **C.** Cuantificación de granos de polen germinados. **D.** Germinación y elongación del tubo polínico *in vitro*, bajo microscopio de luz (100X). **E.** Cuantificación de la elongación del tubo polínico. Los asteriscos ($\alpha = 0,05$) indican los niveles de significancia estadística: **** p value < 0,0001; *** p value < 0,001; **Ns:** no significativo. Barras =100 μ m.

5.2.2 Cuantificación de semillas por silicua y tamaño de la silicua.

Luego de observar que existieron defectos en la línea germinal masculina en *Atzat4* (+/-), se evaluó su fertilidad, comparándola con el genotipo WT. Para esto, se cuantificó el número de semillas por silicuas, utilizando silicuas decoloradas. Los resultados mostraron un reducido número de semillas en *Atzat4* (+/-), lo cual además se asoció a un mayor número de óvulos no fertilizados (**Figura 12A y 12B**). En *Atzat4* (+/-) se observó un número cercano a las 26 semillas por silicua para *Atzat.1* y *Atzat.2*. Las plantas WT tuvieron aproximadamente 40 semillas por silicua. Igualmente, se cuantificó el tamaño de las silicuas. Los resultados revelaron una reducción significativa en el tamaño de la silicua en el fenotipo mutante, reduciéndose a un promedio de 12 y 13 mm en *Atzat.1* y *Atzat.2*, respectivamente, en comparación con los 14,5 mm en promedio del WT (**Figuras 12B y 12C**).

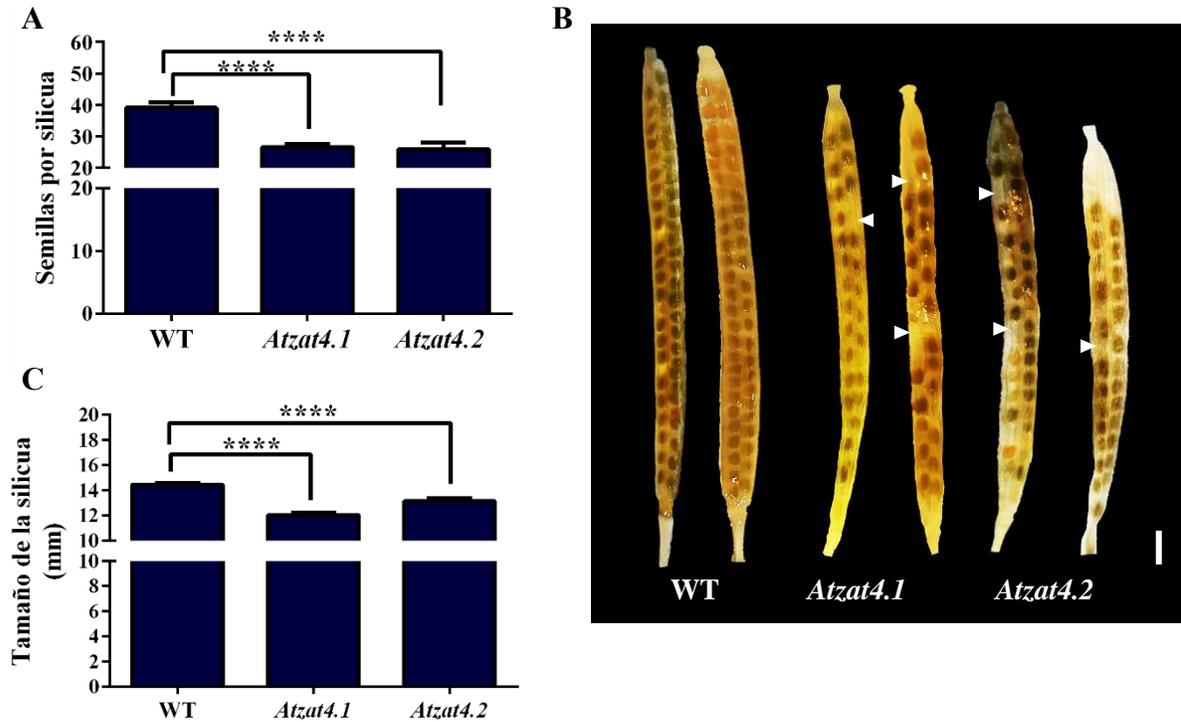


Figura 12. Fertilidad del mutante *Atzat4* (+/-) comparado con el ecotipo Col-0 (WT) de *Arabidopsis thaliana*. **A.** Cuantificación de semillas por silicua. **B.** Silicuas decoloradas con semillas desarrolladas y óvulos no fertilizados (punta de flechas blancas). **C.** Tamaño de las silicuas. Los asteriscos ($\alpha = 0,05$) indican los niveles de significancia estadística: **** p value $< 0,0001$. Barra = 1 mm.

5.2.3 Viabilidad y germinación de las semillas.

Al determinar que el número de semillas por silicua era reducido en el mutante *Atzat4* (+/-), y que además el tamaño del fruto era menor al ser comparado con el fenotipo WT, se procedió a realizar el análisis de la viabilidad de las semillas y su capacidad germinativa. Para esto se utilizó Test de TZ, el cual se basa en la actividad de deshidrogenasas en los embriones, las cuales reducen el TZ (incolore) en formazán (rojo) (Vishwanath et al., 2014; Berridge et al., 1996). Este test mostró que la viabilidad de las semillas también se reducía significativamente en el mutante *Atzat4* (+/-) al ser comparado con el WT, presentando un significativo aumento en las semillas inviables en el fenotipo mutante, donde se alcanzó un 60% de viabilidad, comparado con el 98% en el WT (**Figuras 13A y 13B**). De igual manera, y como era de esperar

en base a los resultados de viabilidad, la germinación de las semillas también se redujo significativamente en *Atzat4* (+/-), con un 49%, versus el 88% de germinación en el WT (**Figura 13C**). Los resultados de la cuantificación de las semillas por silicua y tamaño de la misma, sumado a la menor viabilidad y germinación de las semillas, sugieren una fertilidad reducida en *Atzat4* (+/-).

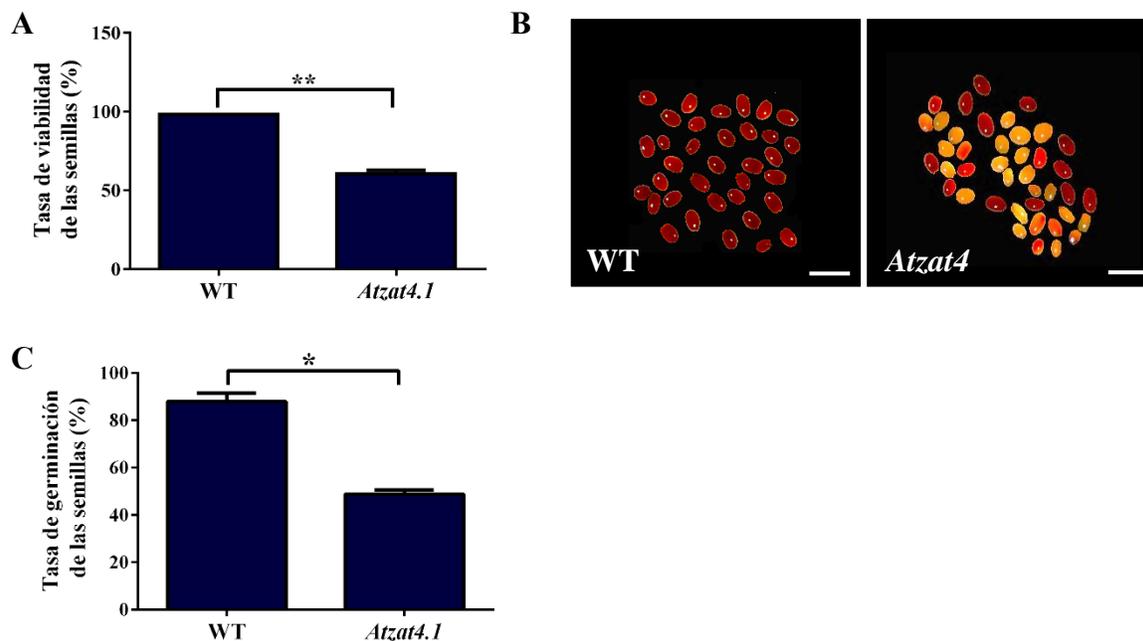


Figura 13. Viabilidad y germinación de semillas del mutante *Atzat4* (+/-) de *Arabidopsis thaliana* en comparación al ecotipo Col-0 (WT). (A-B) Test de Tetrazolio. **A.** Cuantificación de semillas viables. **B.** Viabilidad de semillas en mutante *Atzat4* y del WT; Coloración roja muestra semillas viables, sin coloración semillas inviables y con manchas rosadas semillas anormales. **C.** Cuantificación de semillas germinadas. Los asteriscos ($\alpha = 0,05$) indican los niveles de significancia estadística: **: p value < 0,01; *: p value < 0,05. Barras = 1 mm.

5.2.4 Número de hojas por roseta.

Para evaluar si además del defecto en la línea germinal masculina, y la reducida fertilidad de *Atzat4* (+/-), se veía afectado el desarrollo vegetativo del mutante, se realizó la cuantificación del número de hojas por roseta en fotoperiodo de día largo (16 h luz / 8 h oscuridad). Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas para esta característica entre el fenotipo mutante, con valores promedios de 25 y 23 hojas por roseta en *Atzat.1* y *Atzat.2*, respectivamente, y de 25 hojas por roseta en el WT (**Figura 14**).

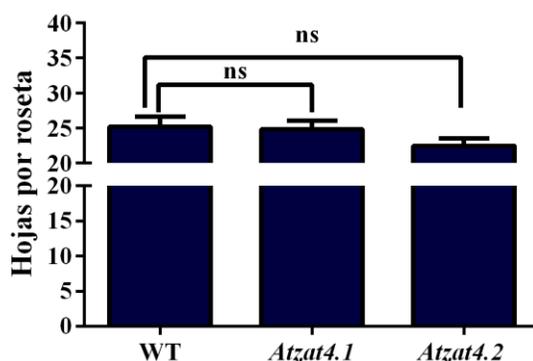


Figura 14. Cuantificación de las hojas por roseta del mutante *Atzat4* (+/-) de *Arabidopsis thaliana* en comparación al ecotipo Col-0 (WT). Plantas de un mes y medio de edad fueron utilizadas para la cuantificación de hojas por roseta en fotoperiodo de día largo (16 h luz / 8 h oscuridad). No se observaron diferencias significativas entre el mutante *Atzat4* (+/-) y el WT. Ns: no significativo ($\alpha = 0,05$).

5.3 Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* con la construcción prom35S::VviPSZ3/Atzat4 mostraron corrección del fenotipo del mutante *Atzat4* (+/-).

5.3.1 Germinación y elongación del grano de polen.

Para determinar si la actividad de *VviPSZ3* sobre el genotipo mutante era capaz de corregir los defectos fenotípicos que presentaba el mutante *Atzat4* (+/-), se utilizaron plantas transgénicas de *A. thaliana* conteniendo la construcción prom35S::VviPSZ3/Atzat4 y se

evaluaron aquellos caracteres que mostraron defectos en el mutante. Primero se evaluó la germinación y elongación del tubo polínico *in vitro*, utilizando las mismas condiciones de crecimiento que en la caracterización del fenotipo mutante. Los resultados revelaron que la germinación y elongación del tubo polínico *in vitro* de dos líneas transgénicas (L16 y L26) no mostraron diferencias significativas con el genotipo WT. Los tres genotipos presentaron una germinación del polen cercana al 50%, y tubos polínicos por sobre los 320 μm de longitud (Figura 15). Esto demostró que para estos caracteres se corrigió el fenotipo mutante, y se restauró el fenotipo observado para las plantas WT de *A. thaliana*.

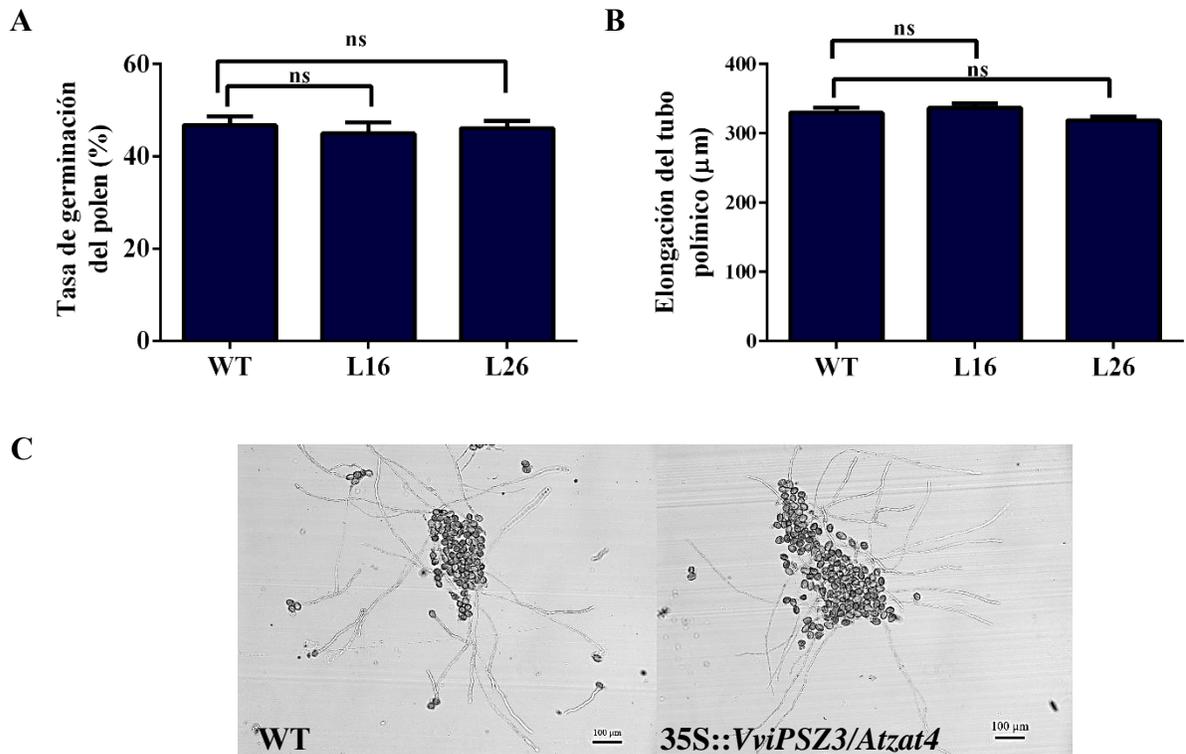


Figura 15. Línea germinal masculina de plantas transgénicas prom35S::VviPSZ3/Atzat4 comparada con el ecotipo Col-0 (WT) de *Arabidopsis thaliana*. A. Cuantificación de granos de polen germinados. **B.** Cuantificación de la elongación del tubo polínico. **C.** Germinación y elongación del tubo polínico *in vitro* bajo microscopio de luz (100X). Ns: no significativo ($\alpha = 0,05$). Barras = 100 μm .

5.3.2 Número de semillas por silicuas y tamaño de la silicua en plantas transformadas con construcción *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*.

La fertilidad en *Atzat4* (+/-) se vio reducida en relación al número de semillas por silicua y el tamaño de las mismas. Por esta razón, y para determinar si en las plantas transgénicas de *A. thaliana*, conteniendo la construcción *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*, se corregía la fertilidad en relación a estas características, se decoloraron silicuas de plantas transgénicas conteniendo dicha construcción y se cuantificó el tamaño de las silicuas. Los resultados mostraron que, además de corregirse el fenotipo en la línea germinal masculina, el número de semillas por silicua y tamaño de las silicuas eran equivalentes al WT y no se observaron diferencias significativas entre ambos. Tanto el WT, como las plantas transgénicas *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*, mostraron aproximadamente 40 semillas por silicua y con silicuas de longitud promedio de 12,5 mm (Figura 16). Esto sugiere que al igual que la corrección de la línea germinal masculina, se corrigió la fertilidad del mutante y se recupera el fenotipo WT.

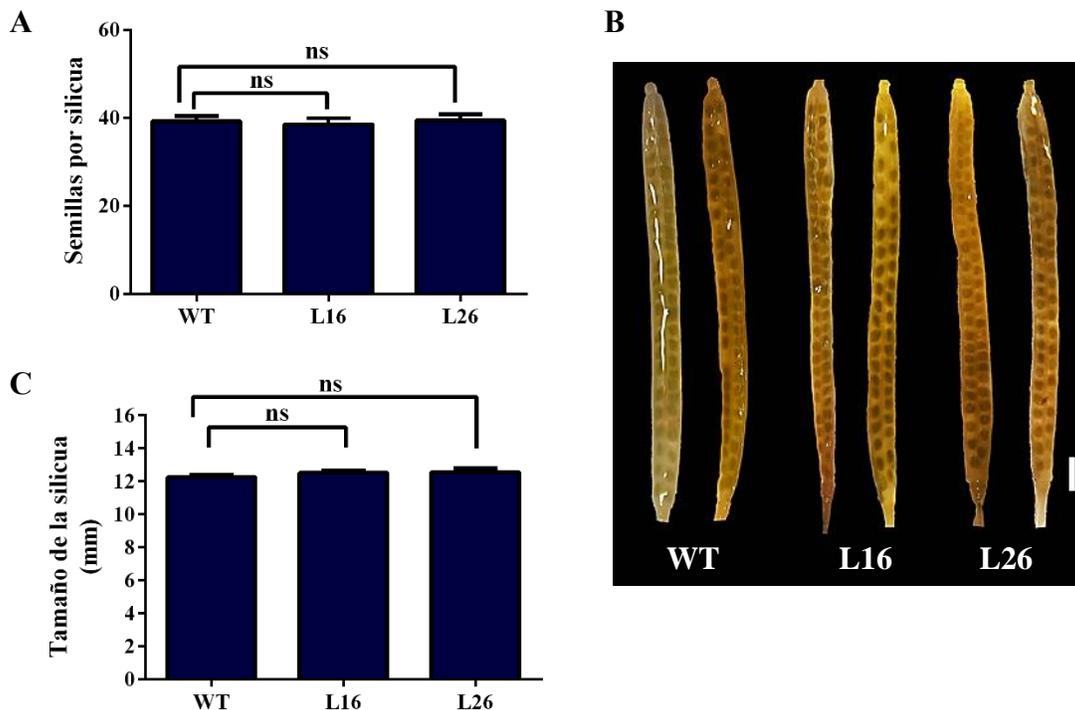


Figura 16. Fertilidad de plantas transgénicas *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* comparada con el ecotipo Col-0 (WT) de *Arabidopsis thaliana*. **A.** Cuantificación de semillas por silicua. **B.** Silicuas decoloradas con semillas desarrolladas. **C.** Tamaño de las silicuas. **Ns:** no significativo ($\alpha = 0,05$). Barra = 1 mm.

5.3.3 Viabilidad y germinación de las semillas en plantas transformadas con la construcción *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*.

La viabilidad y germinación de las semillas fue evaluada en las plantas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con la construcción *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*. Al igual que para la caracterización del mutante, la viabilidad de las semillas fue analizada usando el test de TZ. Los resultados obtenidos revelaron que, tanto la viabilidad, como la germinación de las semillas de las plantas transgénicas (L16 y L26) no presentaron diferencias significativas con el genotipo WT. Las plantas transgénicas y el WT mostraron una tasa de viabilidad de las semillas cercanas al 85%, y una tasa de germinación cercana al 90% (**Figura 17**).

Los resultados anteriores evidenciaron una corrección del fenotipo mutante por la complementación con el gen *VviPSZ3*.

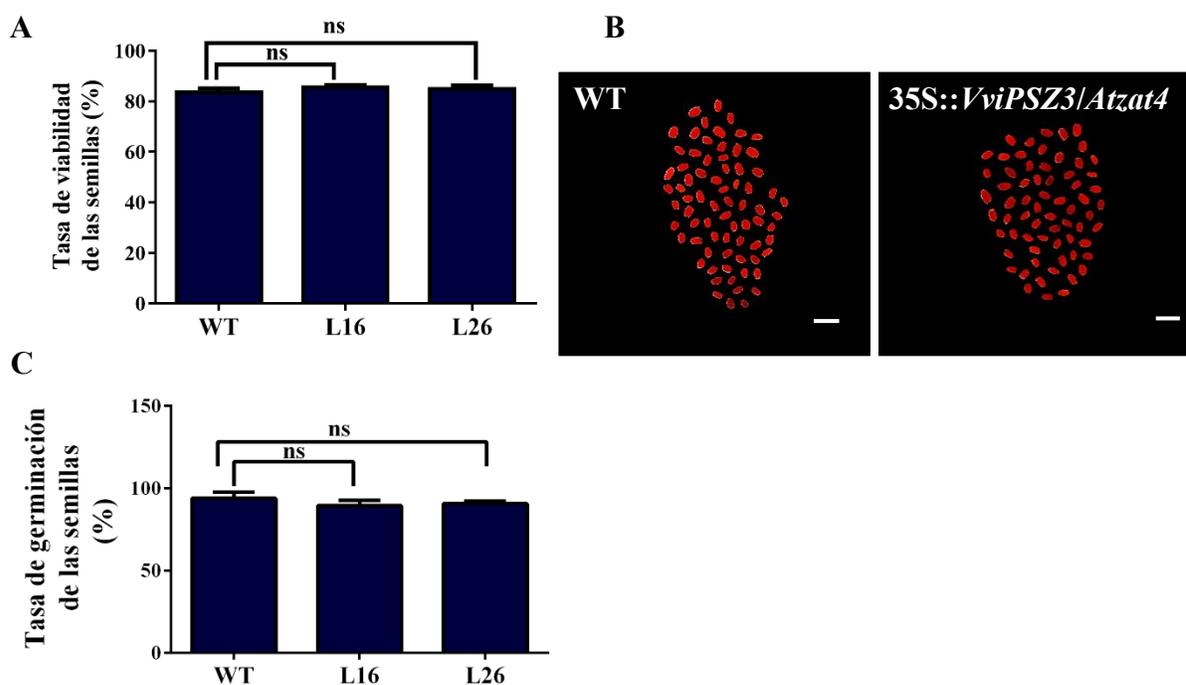


Figura 17. Viabilidad y germinación de semillas de plantas transgénicas *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* comparada con el ecotipo Col-0 (WT) de *Arabidopsis thaliana*. (A-B) Test de Tetrazolio (TZ). A. Cuantificación de semillas viables. B. Viabilidad de semillas en mutante *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* y del WT; Coloración roja muestra semillas viables, sin coloración semillas inviables y con manchas rosadas semillas anormales. C. Cuantificación de semillas germinadas. **Ns: no significativo ($\alpha = 0,05$). Barras = 1 mm.**

5.3.4 Los promotores de *VviPSZ3* y *AtZAT4* mostraron actividad temporal y espacial similar en plantas de tabaco transformadas.

Para analizar si los genes *VviPSZ3* y *AtZAT4* mostraban actividad transcripcional similar en los diferentes tejidos florales, se realizó análisis histoquímico de la tinción GUS en plantas de *N. tabacum* cv. Xanthi. Para esto se contaba con líneas transgénicas conteniendo los promotores de cada gen fusionado al gen reportero *GUS*, *promVviPSZ3::GUS* y *promAtZAT4::GUS*. Tinciones de flores completas para ambas construcciones reveló que ambos promotores presentaron una actividad similar, observándose la mayor actividad GUS en las anteras de los estambres (**Figuras 18D y 18I**) y en los sépalos (**Figuras 18B y 18G**). Asimismo, se observó tinción en el estigma del pistilo (**Figuras 18E y 18J**) y en menor cantidad en los pétalos (**Figuras 18C y 18H**). Este resultado complementa lo sugerido con los resultados anteriores, de que ambos genes, *AtZAT4* en *A. thaliana* y *VviPSZ3* en vid, son putativos ortólogos y que presentan similitud en las funciones que estarían cumpliendo durante el desarrollo de las anteras y polen.

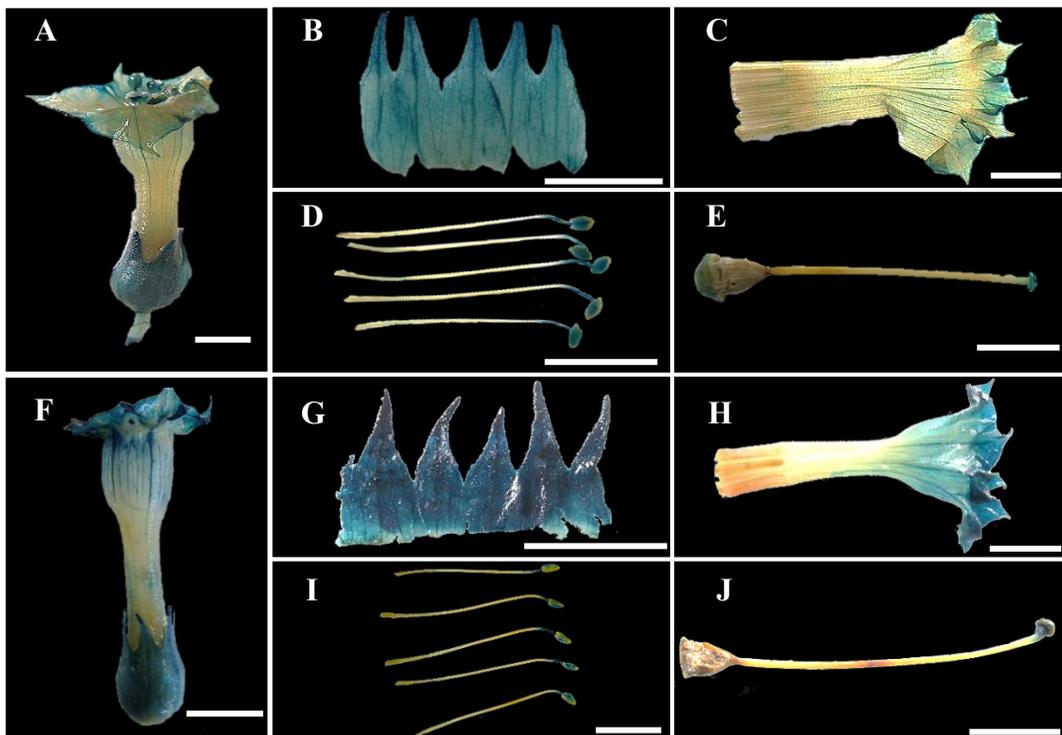


Figura 18. Actividad GUS en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi con las construcciones promVviPSZ3::GUS y promAtZAT4::GUS. (A-E) promVviPSZ3::GUS. A. Flor completa. B. Sépalos. C. Pétalos. D. Estambres. E. Pistilo. (F-J) promAtZAT4::GUS. F. Flor completa. G. Sépalos. H. Pétalos. I. Estambres. J. Pistilo. Barras = 1 cm.

5.4 Genes involucrados en el desarrollo reproductivo de *A. thaliana* se expresan diferencialmente en flores.

Para identificar genes involucrados con el desarrollo de polen y semillas que estuviesen siendo expresados diferencialmente en plantas *Atzat4* (+/-), al ser comparados con el WT, o con plantas transformadas con la construcción prom35S::VviPSZ3/*Atzat4*, se realizó RNA-seq de botones florales en estadio 12 del desarrollo de *A. thaliana* (Smyth et al., 1990; Cardarelli and Cecchetti, 2014). Los resultados de la cuantificación de la expresión de las lecturas mapeadas en relación a la anotación del genoma indexado de *Arabidopsis* (versión TAIR 10) reveló que las tres réplicas biológicas de cada genotipo estudiado, se agrupaban dentro del mismo clúster de expresión (**Figura S1**). Por el contrario, la agrupación jerárquica mostró que los genotipos diferentes se encontraban distantes unos de otros (**Figura S1**). Con estos resultados se procedió a realizar el análisis de la expresión génica diferencial.

5.4.1 Análisis de *Gene Ontology* de genes diferencialmente expresados en el RNA-seq.

Se realizó el análisis de GO de alrededor de 11.000 genes regulados negativamente o positivamente. Los resultados del análisis de GO redujo los términos en base a la significancia estadística (*adjusted p-value* $\leq 0,05$) dando como resultado 172 y 273 términos GO de genes regulados negativa o positivamente, respectivamente, para la primera comparación, *Atzat4* (+/-) con el WT. Para la comparación de prom35S::VviPSZ3/*Atzat4* con *Atzat4* (+/-) se generaron 36 y 395 términos GO de genes regulados negativa o positivamente, respectivamente. Por otra parte, los términos GO para prom35S::VviPSZ3/*Atzat4*, comparado con el WT, fueron 103 términos GO para genes regulados negativamente, y 359 términos GO para genes regulados positivamente.

Los resultados, fueron separados de acuerdo a las diferentes comparaciones de genotipos analizadas por RNA-seq, y se generaron gráficas que muestran los términos GO significativos y no redundantes. Los ejes de las gráficas no tienen un significado intrínseco, donde los términos similares semánticamente permanecen cercanos en el gráfico. El tamaño de los círculos indica la frecuencia del término GO y el color el *p-value* (Supek et al., 2011).

Para la primera comparación, *Atzat4* (+/-) con el WT, se pudo observar, tanto en la gráfica de genes regulados negativamente (**Figura 19A**), como para aquellos regulados positivamente (**Figura 19B**), términos GO asociados a procesos biológicos como “reproducción”, “procesos del desarrollo”, “regulación de procesos reproductivos” y “procesos reproductivos”, “desarrollo de la estructura anatómica, entre otros términos asociados al desarrollo reproductivo en *A. thaliana*. Pero, además, destacó en el set de genes regulados positivamente, la presencia de genes asociados al “ciclo celular”, “división celular” y “biogénesis de la pared celular” (**Figura 19B**). En relación a la comparación de los resultados de la expresión diferencial en *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*, comparado con *Atzat4* (+/-), se observó una gran diferencia entre los procesos biológicos, en los cuales se agruparon los genes regulados negativamente, con los procesos biológicos asociados a los genes regulados positivamente. La gráfica para los términos GO de los genes regulados negativamente, revelaron un número reducido de procesos asociados a la “respuesta a estímulos”, “transporte”, “localización” y “establecimiento de la localización”, “procesos metabólicos” y “procesos biológicos” (**Figura 19C**). Una situación opuesta se observó en la gráfica de los procesos biológicos asociados a los genes regulados positivamente, donde destacaron el “procesos del desarrollo”, “reproducción”, “desarrollo y organización estructural de los meristemas”, “desarrollo del gametofito y del polen”, así como también el “fase de transición de meristema vegetativo a meristema reproductivo” (**Figura 19D**). Además, de genes asociados al “ciclo y división celular”. Finalmente, al evaluar las gráficas de términos GO para *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*, comparado con el WT. Se observó situaciones muy diferentes para los genes regulados negativamente y los regulados positivamente. Los genes regulados negativamente se agruparon en procesos biológicos, tales como, “respuestas de defensa y ante estrés”, “regulación de procesos biológicos”, “regulación biológica”, “señalización” y “procesos de múltiples organismos” entre otros (**Figura 19E**). En cambio, los genes regulados

positivamente se agruparon en términos de GO asociados a la “reproducción”, “procesos del desarrollo y reproductivos”, “desarrollo del gametofito”, “desarrollo del saco embrionario”, así como también asociados al “ciclo y división celular” (**Figura 19F**).

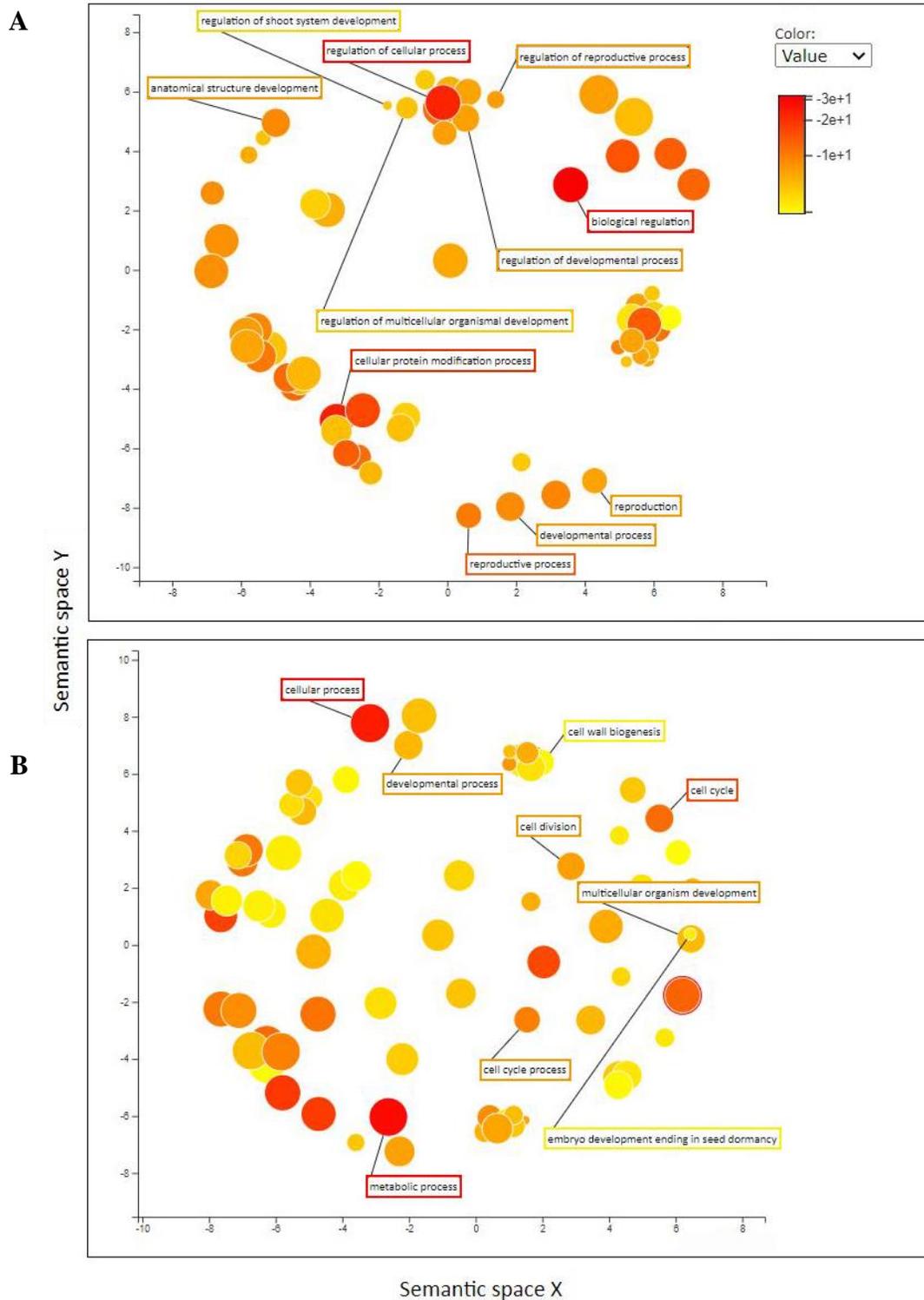


Figura 19. Análisis de ontología genética (GO) de genes diferencialmente expresados en flores de *Arabidopsis thaliana*. (A-B) Plantas *Atzat4* (+/-) comparadas con el WT. A. Genes regulados negativamente. B. Genes regulados positivamente.

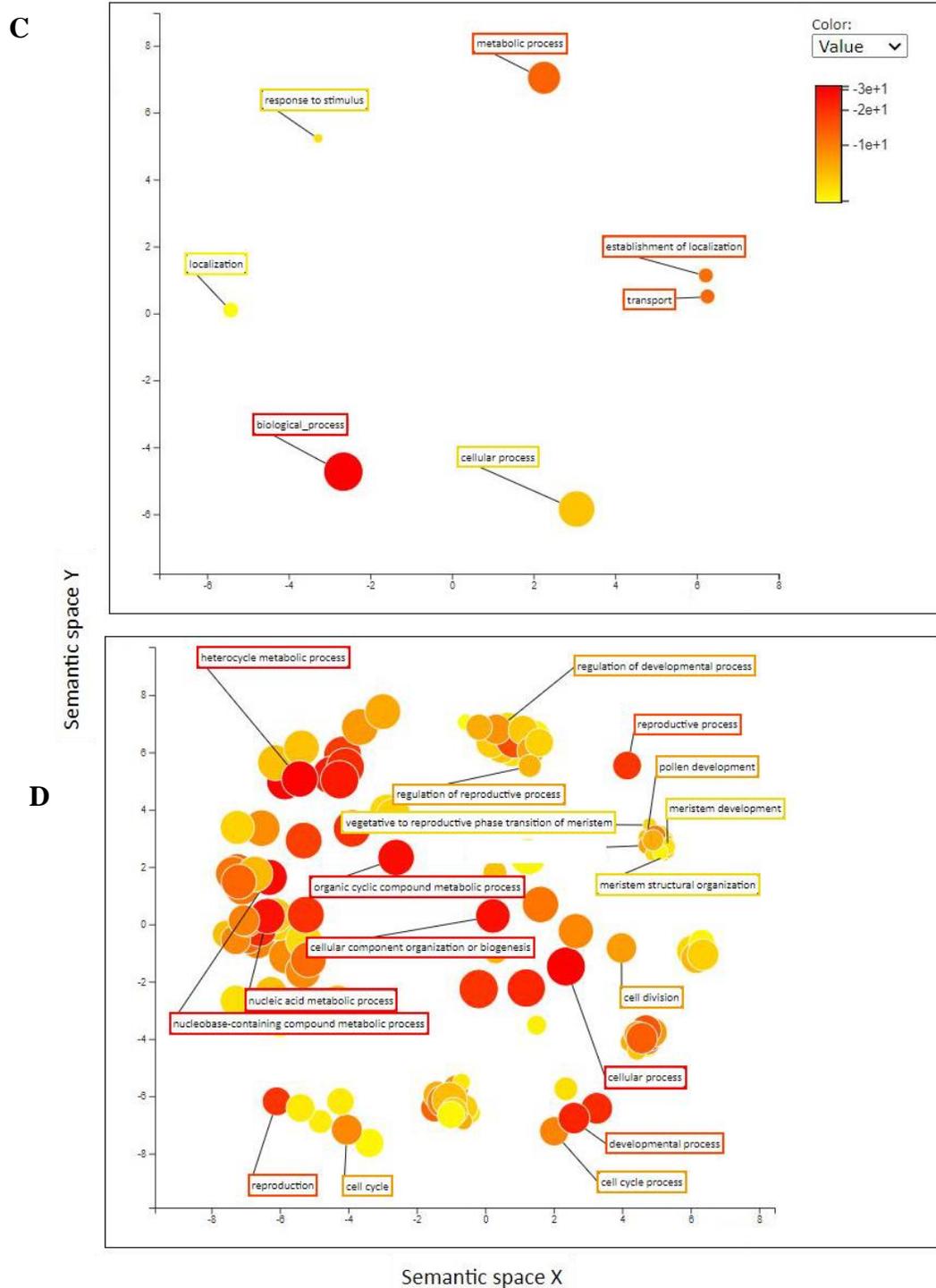


Figura 19. Análisis de ontología genética (GO) de genes diferencialmente expresados en flores de *Arabidopsis thaliana*. (C-D) Plantas transformadas *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*

comparadas con plantas *Atzat4* (+/-). **C.** Genes regulados negativamente. **D.** Genes regulados positivamente. (Continuación).

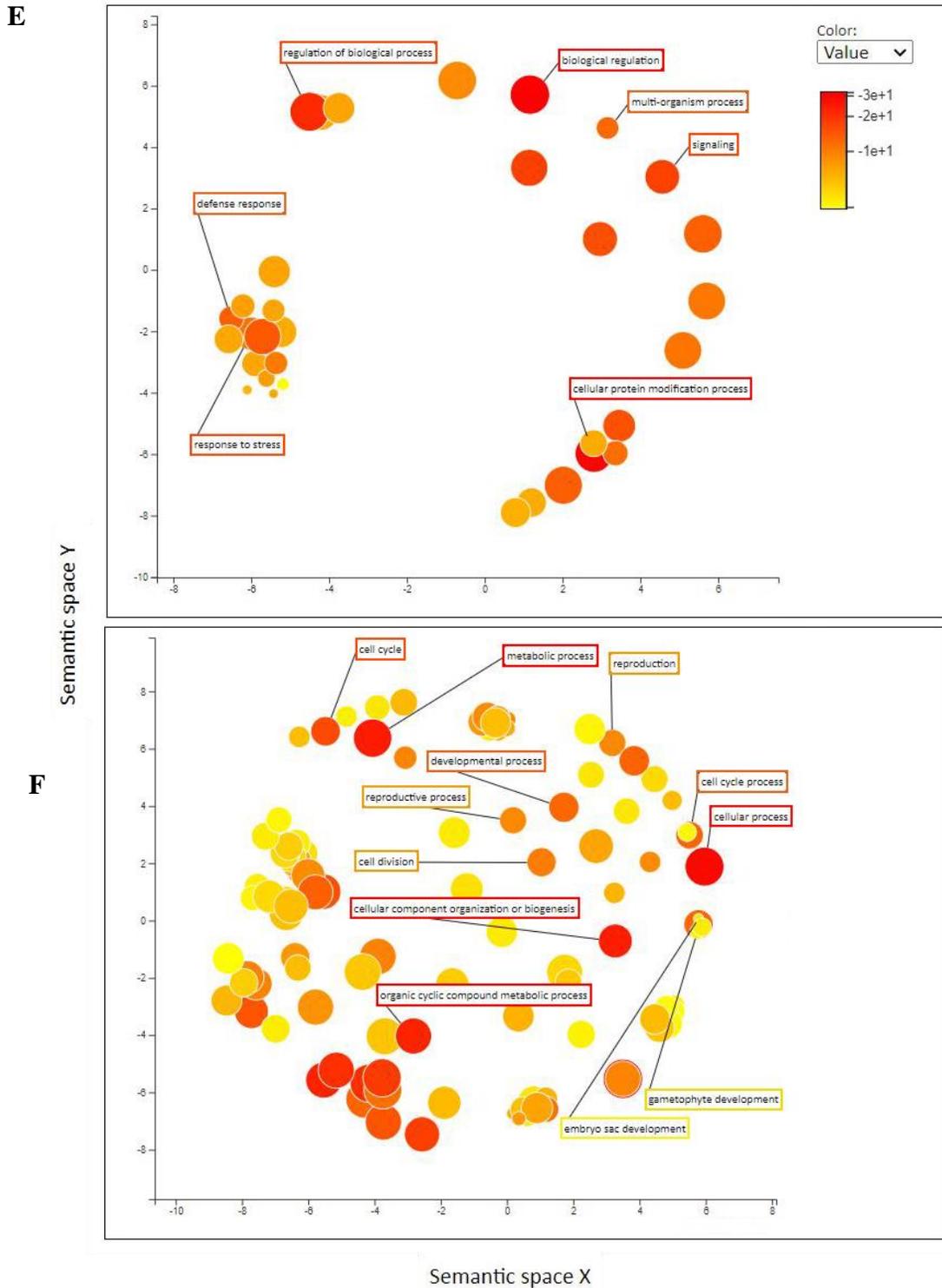


Figura 19. Análisis de ontología genética (GO) de genes diferencialmente expresados en flores de *Arabidopsis thaliana*. (E-F) Plantas transformadas con *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*

comparadas con el WT. **E.** Genes regulados negativamente. **F.** Genes regulados positivamente. El tamaño de los círculos indica la frecuencia del término GO en la base de datos y el color de los círculos representa el *p-value* (Supek et al., 2011). (Continuación).

5.4.2 Genes involucrados en el desarrollo reproductivo de *A. thaliana* son putativos blancos de VviPSZ3 y AtZAT4.

Con los resultados del GO se seleccionaron genes que estuviesen involucrados en el desarrollo reproductivo en *Arabidopsis*, basándose en el \log_2FC (o diferencia relativa), que permite identificar la expresión diferencial de genes, determinando si hubo cambios en la expresión de un gen bajo dos condiciones diferentes (Feng et al., 2012; Love et al., 2014). Aquellos genes involucrados en diferentes momentos del desarrollo floral o en el desarrollo de polen y semillas, que mostrasen estar regulados positivamente o regulados negativamente, y que mostrasen significancia estadística (*p-value* <0,05), en al menos una comparación, fueron graficados en un *Heat map*. Además, se graficaron en él, genes involucrados en otros procesos biológicos, que mostraron una expresión diferencial significativa (**Figura 20**). El *Heat map* se realizó con 114 genes.

Primero, se identificaron los genes diferencialmente expresados en botones florales de *Atzat4* (+/-) comparándolo con el WT, y se observaron diversos genes cuya función se encuentra asociada al desarrollo reproductivo en *A. thaliana*. Se identificaron genes involucrados en el desarrollo del embrión y semillas, los cuales fueron nombrados como “*Genes del desarrollo del embrión y las semillas*” (*GDS*). También, fueron identificados genes asociados al desarrollo y maduración del polen, a los cuales se les denominó “*Genes del desarrollo y maduración del polen*” (*GDP*). Además, se identificaron genes asociados al proceso de la doble fecundación y la conducción del tubo polínico hasta la ovocélula, los cuales fueron nombrados como “*Genes del proceso de doble fecundación*” (*GPF*). Igualmente, se identificaron genes asociados al desarrollo de la cubierta del polen, desarrollo de la pared del polen y muerte celular programada del *tapetum* (*GDP*) (**Figura 20 y Tabla S3**).

En el grupo de genes regulados negativamente, destacaron aquellos asociados con el desarrollo del tubo polínico (*GPF*) con valores de \log_2FC cercanos a -1,2. Además de genes asociados a la doble fecundación con valores de \log_2FC entre -1,1 y -1,5, igualmente el resultado

del RNA-seq permitió identificar genes regulados negativamente, con valores < -1 , que se encuentran bien caracterizados, como importantes en la doble fecundación, los cuales codifican para pequeños péptidos ricos en cisteínas, necesarios para la conductancia del tubo polínico (LURE) (Johnson et al., 2019). Entre los genes identificados se encuentra AT4G13890 con un \log_2FC de $-2,1$, el cual se encuentra asociado al desarrollo del polen. Si bien este gen no se encuentra caracterizado, se ha identificado que la mutación del gen conduce a defectos en el desarrollo del grano de polen (Boavida et al., 2009). Varios genes con valores de $\log_2FC \geq -1$, regulados negativamente, fueron también candidatos por su putativa función en el desarrollo y maduración del polen (*GDP*), destacando aquellos que se encuentran bien caracterizados: AT3G11980 (*MS2*), requerido para la formación de la pared del grano de polen (Chen et al., 2011); AT5G22260 (*MS1*), requerido para el desarrollo del *tapetum* y biosíntesis de la pared del polen (Yang et al., 2007) y *DAZI* (AT2G17180), el cual participa de la PMII (Borg et al., 2014). Por otra parte, también fueron regulado negativamente los genes *PCR11* (AT1G68610) y *MAPKKK20* (AT3G50310) los cuales, se han identificado como un putativos participantes de la diferenciación de las células espermáticas y son blancos directo del factor de transcripción DUO1 (Borg et al., 2011) (**Figura 20 y Tabla S3**).

Por otro lado, se identificaron genes asociados al desarrollo del embrión y semillas (*GDS*), con valores de \log_2FC entre $-1,1$ y $-3,8$. Este último valor corresponde a AT2G01280, el cual se encuentra anotado con una putativa función durante el desarrollo del embrión y latencia del mismo. Asimismo, AT1G10745 mostró un \log_2FC de $-2,4$. Igualmente, genes con valores ≥ -1 , regulados negativamente, parecen estar involucrados en estos procesos. Además, genes anotados con una putativa función en el desarrollo floral presentaron valores de $\log_2FC \leq -2$, entre ellos AT1G60980 (*GA20OX4*), con un \log_2FC de $-2,6$ y AT5G36240 con un \log_2FC de $-2,9$. Es de interés destacar, que genes asociados en respuestas de defensa se vieron reprimidos, con valores de \log_2FC de entre $-2,1$ y $-3,3$, puesto que varios genes *AtZAT*, han sido caracterizado en respuesta a diferentes estreses (Wang et al., 2019) (**Figura 20 y Tabla S3**).

En relación a los genes regulados positivamente en *Atzat4* (+/-) asociados a algún proceso del desarrollo floral en *A. thaliana*, fueron un número menor. Destacando, AT3G05727 con un \log_2FC de $3,11$ el cual se encuentra anotado en la base de datos de NCBI como miembro de la familia de proteínas de la cubierta del polen (*GDP*) que se une a la glucoproteína 1,

relacionada con el locus S (SLR1). Por otra parte, dos genes expresados durante el desarrollo del embrión (*GDS*) y anotados en NCBI como miembros de la superfamilia de proteínas de almacenamiento de la semilla 2S albumina (AT2G37870 y AT4G12490), se vieron regulados positivamente con valores del \log_2FC de 2,3 y 5,3, respectivamente. Con valores de \log_2FC inferiores, se identificaron dos genes asociados al desarrollo floral, AT1G65480 y AT2G40080, con 1,07 y 1,87, respectivamente. Otros genes regulados positivamente, con valores de $\log_2FC < 1$ fueron identificados, asociados al desarrollo floral, desarrollo de la pared del grano de polen y desarrollo del tubo polínico (**Figura 20 y Tabla S3**).

Posteriormente, se realizó el análisis de los genes que se regulaban positivamente o se regulaban negativamente en los botones florales de las plantas transgénicas *prom35S::VviPSZ3/Atzta4*, al compararlas con la expresión en las plantas mutantes *Atzta4 (+/-)*. Al evaluar la lista de genes regulados negativamente se identificaron genes asociados al desarrollo floral, con valores de $\log_2FC \leq -2$. Específicamente, para el desarrollo del tubo polínico y la doble fecundación (*GPF*), AT5G43513, registró un \log_2FC de -2 (*LURE*) (Okuda et al., 2009). AT1G49770 (*RGE*) (Kondou et al., 2008), el cual se ha asociado al desarrollo del embrión que termina en la latencia de la semilla (*GDS*), tuvo un \log_2FC de -2,3. Con valores de $\log_2FC \geq -1$ y $\leq -1,9$ se identificaron diversos genes asociados a la conductancia del tubo polínico y el proceso de doble fecundación, algunos de ellos son: AT2G14378, AT5G43518, AT5G64720, AT2G21740, entre otros. Así como también, al desarrollo del embrión y las semillas, entre ellos: AT5G61730, AT3G20210, AT4G13890, AT1G02580, entre otros. Otros genes que se graficaron en *heat map*, y que mostraron una variación en la expresión con valores de $\log_2FC \geq -0,9$ mostraron funciones asociadas a diferentes momentos del desarrollo del grano de polen (*GDP*), en especial aquellos asociados a la cobertura del grano de polen (AT3G42473, AT4G09153, AT3G06985). Así como también, aquellos asociados al desarrollo del tubo polínico y el proceso de doble fecundación (AT2G21750, AT1G22130). Destaca que dentro de estos genes también se encuentra expresado diferencialmente *DAZI* (AT2G17180) (Borg et al., 2014) (**Figura 20 y Tabla S4**).

Luego, al evaluar los genes que eran regulados positivamente, se pudo distinguir que con valores de $\log_2FC \geq 1$ los genes *MS1*(AT5G22260), *MS2* (AT3G11980), *PCR11*(AT1G68610) y *MAPKKK20* (AT3G50310) (*GDP*) (Yang et al., 2007; Borg et al., 2011; Chen et al., 2011)

estaban siendo regulados positivamente en plantas transgénicas *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*, al compararlas con la expresión en plantas *Atzat4* (+/-). Así como también, genes asociados al desarrollo de la pared (*GDP*) y el crecimiento del tubo polínico (*GPF*), tales como AT5G55020 (*MYB120*) (Liang et al., 2013), AT4G22600 (*INP1*) (Li et al., 2018), AT1G62940 (*ACOS5*) (Wang et al., 2018) y AT5G56110 (*MYB80*) (Zhang et al., 2007), al igual que genes con putativas funciones durante el desarrollo de la semilla (*GDS*), como por ejemplo, AT2G41260 (*MI7*) (Raynal et al., 1999; Hundertmark and Hinch, 2008) (**Figura 20 y Tabla S4**).

Finalmente, se realizó el análisis de la expresión diferencial de genes, comparando las plantas *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* con el WT. Se pudo observar que varios genes asociados al desarrollo de la cobertura del polen (*GDP*), así como también, asociados al desarrollo del tubo polínico y el proceso de doble fecundación (*GPF*), eran regulados negativamente, con valores de \log_2FC entre -2 y -3. Entre ellos, genes *LUREs* (AT5G43518, AT5G43513, AT5G43510, AT5G43285). Por otra parte, dentro de este grupo de genes destacó AT4G18770 (*MYB98*), el cual se encuentra asociado a la conducción del tubo polínico (Kasahara et al., 2005). También, mostraron resultados significativos en expresión diferencial, genes asociados al desarrollo floral y desarrollo del embrión y semillas (*GDS*), con valores de $\log_2FC \leq -2$. Por ejemplo, AT3G07005 (δ -*VPE*), involucrado en el desarrollo de las semillas (Nakaune et al., 2005). Además, con valores de \log_2FC entre -1 y -2 se identificaron genes con funciones similares, tales como, la muerte celular programada del *tapetum* (*GDP*) (AT5G50260), maduración del grano de polen y desarrollo del tubo polínico (AT2G47040). También se observó la regulación negativa de *DAZI* (Borg et al., 2014). Por otra parte, genes regulados positivamente con valores de \log_2FC entre 1 y 2, fueron asociados a diferentes momentos del desarrollo floral, maduración del polen (*GDP*) y desarrollo de la semilla (*GDS*) (**Figura 20 y Tabla S2**). Por ejemplo, se identificó a AT1G69500 (*CYP704B1*), el cual está involucrado en la formación de la pared del grano de polen (Dobritsa et al., 2009), así como también, *MI7* (AT2G41260) (Raynal et al., 1999; Hundertmark and Hinch, 2008).

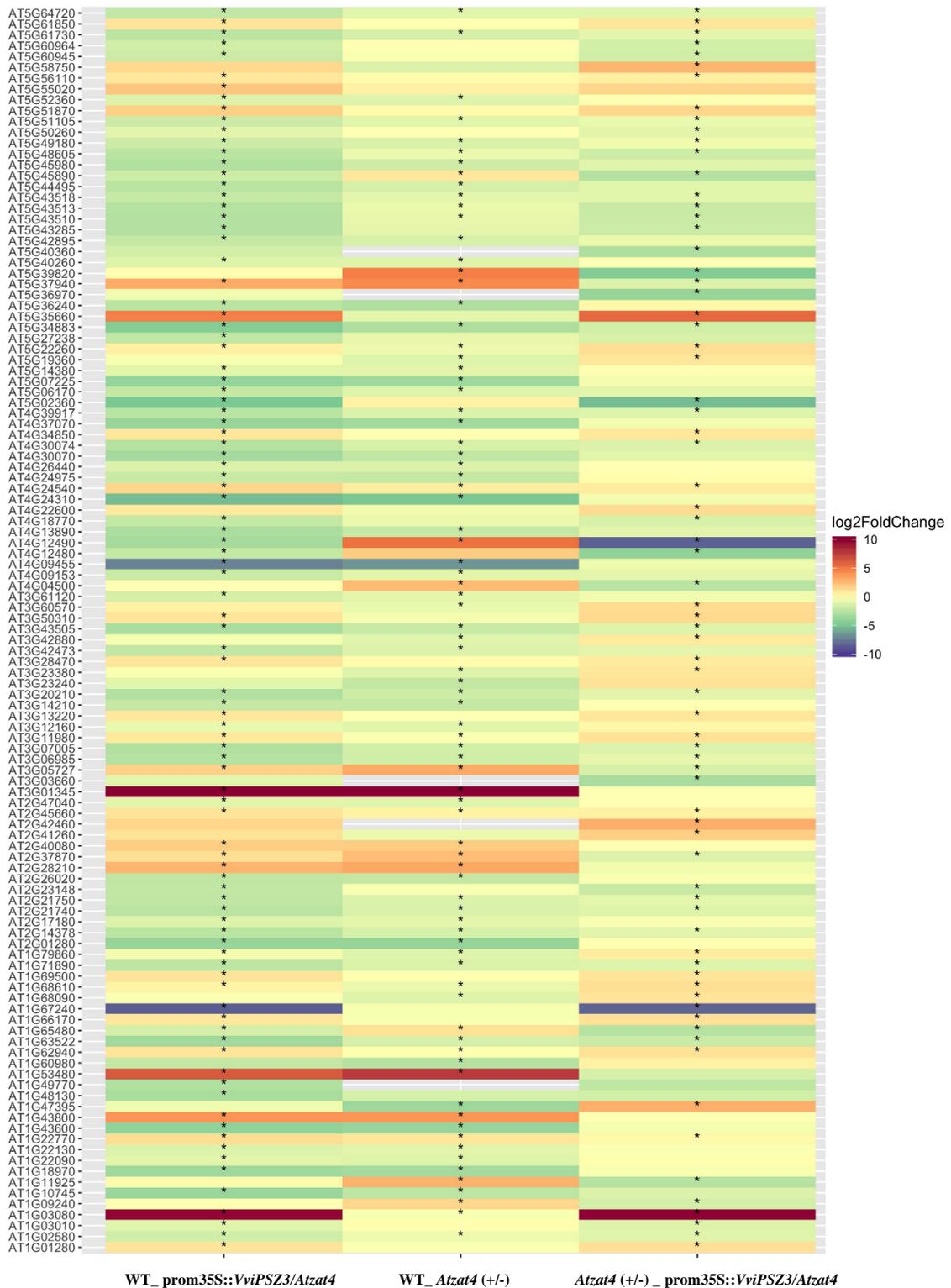


Figura 20. Patrón de expresión diferencial en tres genotipos de *Arabidopsis thaliana*. Comparación por genoma del \log_2 Fold Change (\log_2 FC) los colores muestran genes regulados positivamente (tonos rojizos) o regulados negativamente (tonos azulados) (ver leyenda). Los

espacios vacíos (sin color) muestran genes que no mostraron expresión diferencial en el RNA-seq. El asterisco representa la significancia estadística con un valor de *p-value* <0,05.

VI DISCUSIÓN

6. 1 Temporalidad del desarrollo floral en *V. vinifera* cv. Carménère.

La floración es una etapa crítica del desarrollo de la planta, para que ocurra una reproducción exitosa, cuando las condiciones externas sean favorables. Este proceso debe conocerse de manera precisa (Bouché et al., 2016). Las flores y los órganos derivados como frutos y semillas son fundamentales para el rendimiento de los cultivos (Lebon et al., 2008). Por esta razón, determinar la temporalidad del desarrollo floral de la vid cv. Carménère resulta de importancia al momento de desarrollar estrategias de mejoramiento cualitativo y cuantitativo del fruto.

Las flores y sus órganos derivados como los frutos y las semillas, son los principales componentes del rendimiento de los cultivos (Lebon et al., 2008). En esta tesis, se identificaron por primera vez, los estadios del desarrollo de la inflorescencia de la vid cv. Carménère, los cuales fueron posicionados de acuerdo al sistema descrito por Eichhorn and Lorenz (1977) y modificado por (Coombe, 1995). Este sistema se basa en 47 estadios del desarrollo con seis etapas principales. Estos estadios, se determinaron de acuerdo al largo del brote y en el número de hojas separadas. De acuerdo a este trabajo, se contaba con inflorescencias desde el estadio 12 al estadio 19 del sistema E-L (**Tabla 2 y Figura 4**). De acuerdo, a la descripción de este sistema de caracterización fenológica de la vid, el desarrollo de la inflorescencia y del brote ocurre entre los estadios 1 y 18, mientras que la floración ocurre entre los estadios 19 y 26 (Coombe, 1995). Sin embargo el sistema E-L se basa en caracteres morfológicos y no reflejan necesariamente las etapas del desarrollo de los órganos florales ni etapas esenciales como la meiosis (Lebon et al., 2004).

El desarrollo floral en la vid ocurre en dos temporadas de crecimiento separadas por un periodo de dormancia. En la primera temporada, una estructura meristemática denominada *anlage* se observa en el ápice de yemas latentes; y en condiciones óptimas, el primordio de la inflorescencia se puede desarrollar a partir de estas estructuras. En la segunda temporada, las flores individuales se forman en los primordios de inflorescencias desarrollado previamente (Vasconcelos et al., 2009; Gökbayrak and Engin, 2019). De acuerdo al estudio realizado por Gökbayrak and Engin (2019), en la vid cv. Cabernet Sauvignon, la organogénesis floral comienza con el desarrollo de los sépalos, en el estadio 7 del sistema E-L. En dicho estadio se

observaron los primordios de los sépalos. El desarrollo del cáliz se llevó a cabo entre los estadios 7 y 9. Luego, continúa el desarrollo de la corola y la caliptra en el estadio 9, completándose la formación entre los estadios 9 y 12, donde además se observan las anteras sin la formación de los filamentos. Entre los estadios 12 y 15, se forman los filamentos de los estambres y se comienza a observar el pistilo. Finalmente, en el estadio 15, los estambres y el pistilo están completamente formados. El desarrollo del estambre y por consiguiente, el desarrollo del gametofito masculino es un proceso que requiere de la participación coordinada del tejido esporofítico (anteras) y gametofítico (polen) (Honys et al., 2006). En concordancia con el trabajo de Gökbayrak and Engin, (2019), los resultados de esta tesis, revelaron que el desarrollo del grano de polen comenzaría en el estadio 13, donde se observan células madres del polen y terminaría en el estadio 15, con los granos de polen. Con la identificación de la temporalidad del desarrollo del polen en *vid cv. Carménère*, se identificaron varias fases de la microsporogénesis a partir de PMCs en base al análisis de la dinámica de los cromosomas durante meiosis I y meiosis II (Pereira et al., 2014). La meiosis es un proceso altamente conservado en los organismos eucariotas ocupando un papel central en los ciclos de vida de todos los organismos de reproducción sexual (Armstrong and Jones, 2003; Pereira et al., 2014). El estudio de dos cultivares de vides Gewurztraminer y Pinot Noir, los cuales presentan diferencias en la fertilidad y la sensibilidad a la abscisión de flores, ha demostrado que las etapas de meiosis transcurren entre los estadios 15 y 17 en sistema E-L. En Pinot Noir la meiosis masculina transcurre una semana antes que en Gewurztraminer, por lo cual se establecieron estadios intermedios (estadios 15 + 2 días y 15 + 8 días) (Lebon et al., 2004; Lebon et al., 2005; Lebon et al., 2008). En Pinot Noir la meiosis masculina ocurrió entre los estadios 12 y 15, mientras que la mitosis del polen entre los estadios 15 + 8 días y 17 (Lebon et al., 2005). De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, el desarrollo del grano de polen de la *vid cv. Carménère* tendría lugar entre los estadios 13 y 15 del sistema E-L, observándose diferentes momentos de la microsporogénesis, siendo el estadio 13 donde se observan PMCs, y el estadio 15 en el que se observan granos de polen. Sin embargo, se requieren más estudios para identificar los estadios en los que se termina de llevar a cabo la maduración del grano de polen (Cecchetti et al., 2008). Luego de que ha ocurrido la segunda división mitótica del polen, para obtener así granos de polen tri-celulares, y previo a que se liberen de las anteras, ocurren tres eventos de importancia: (1) la acumulación de almidón o lípidos, como material de reserva para

el grano de polen; (2) la adición de *pollenkitt* o trifina a la exina, a partir de la degradación del *tapetum*; y (3) la deshidratación del citoplasma (Blackmore et al., 2007). En la vid se ha reportado la presencia de numerosos amiloplastos y otras sustancias de almacenamiento, como proteínas y lípidos, necesarios para la división de la célula generativa, la cual transcurre durante la polinización (Abreu et al., 2006).

6.2 Genes descritos en la red regulatoria del desarrollo floral y del grano de polen, en *Arabidopsis*, se expresan diferencialmente en la vid cv. Carménère.

El desarrollo de anteras y polen se encuentra bien descrito en *Arabidopsis* y en otras especies modelos. Sin embargo, en la vid es poco conocida la red regulatoria de genes involucrados en el desarrollo del gametofito masculino. La disponibilidad de plantas de *Arabidopsis* estériles masculinas ha permitido la identificación de numerosos genes claves en la red regulatoria de anteras y polen (Wilson and Zhang, 2009; Verma, 2019). Además, se ha observado que la red de regulación génica de anteras y polen presenta un alto grado de conservación entre *Arabidopsis* y el arroz (Lin et al., 2017).

En *Arabidopsis* el desarrollo floral se realiza de acuerdo al modelo ABCE (Theißen et al., 2016). Así, la identidad de los estambres está determinada por los genes de clase B *AP3* y *PI*; el gen de clase C *AG* y los genes de clase E *SEP1*, *SEP2*, *SEP3* y *SEP4* estos últimos son funcionalmente redundantes (Pelaz et al., 2000; Ó'Maoiléidigh et al., 2014). En el presente estudio, se evaluó la expresión de los genes homeóticos homólogos a los de *Arabidopsis*, involucrados en el desarrollo del estambre en la vid cv. Carménère, los que muestran un patrón de expresión dinámico durante el desarrollo de la inflorescencia (**Figura 6**). *VviAP3*, *VviPI*, mostraron un patrón de expresión similar, el cual incrementa a partir del estadio 12, sin embargo, ambos tienen un máximo de expresión en diferentes, *VviAP3* lo mostró en el estadio 14 y *VviPI* en el estadio 16 (**Figura 6**). Por otra parte, *VviAG*, mostró expresión moderada entre los estadios 12 y 15, con un máximo de expresión en el estadio 16 (**Figura 6**). Estos antecedentes permiten inferir una acción coordinada, entre estos genes, en el desarrollo de los estambres en la vid cv. Carménère. Se ha establecido el modelo del “cuarteto floral” para el modelo ABCE del desarrollo floral, el cual señala que hay al menos un complejo cuaternario único para cada tipo

de órgano floral (Theißen and Saedler, 2001; Theißen and Melzer, 2007). En un trabajo reciente de Palumbo et al., (2019), se describieron genes del modelo ABCDE en *V. vinifera* cv. Pinot Noir. Las muestras de inflorescencias de la vid se clasificaron de acuerdo a la escala de Baggiolini (Baggiolini, 1952; Keller and Baggiolini, 1954). Esta escala se basa en estadios desde la A hasta la P (Coombe, 1995). En la investigación de Palumbo et al., (2019) se utilizaron muestras pre-antesis dentro del estadio G, los cuales corresponden a estadios 15 y 16 del sistema E-L modificado por (Coombe, 1995). Los genes de clase B descritos en dicha investigación corresponden a *VviAP3a*, *VviAP3b* (*VviTM6*) y *VviPI*, los cuales como era de esperar, mostraron niveles altos de expresión en la caliptra (pétalos) y estambres (anteras y filamentos). Similar situación ocurrió al analizar la expresión de *VviPI*, donde los niveles de transcritos eran mayores en la caliptra y en los estambres. Cabe señalar, que se observó una expresión mayor de *VviPI* en los filamentos, que en las anteras de los estambres. En la presente tesis, los genes de clase B *VviAP3* (corresponde a *VviAP3a*) y *VviPI* mostraron un comportamiento similar en su expresión, por lo cual, al igual que lo descrito en literatura, se podría inferir que estos genes coordinan en conjunto el desarrollo de los estambres. También, el gen de clase C, *AG*, parece estar coordinado con los genes de clase B (**Figura 6**). El gen *VviAG* (*VviAG1*) evaluado en este trabajo corresponde a *VvMADS1*, para el cual en primera instancia, su expresión fue identificada en los dos verticilos internos y durante el desarrollo del fruto (Boss et al., 2001). Sin embargo, recientemente se ha identificado la expresión de este gen fuertemente 11 días antes de la floración, en los filamentos de los estambres y una expresión moderada en anteras durante todo el proceso cinético del desarrollo (Palumbo et al., 2019). Por otra parte, los genes de clase E *VviSEP1* y *VviSEP3*, mostraron mayor expresión en los estadios tempranos en el desarrollo de la inflorescencia de la vid cv. Carménère, para desaparecer en estadios del 17 al 19 (**Figura 6**). Estos antecedentes permiten inferir, que estos genes también podrían estar participando en coordinación con los genes de clase B y C en el desarrollo de los estambres. Los genes *SEP* participan de la formación del cuarteto floral junto a los genes de clase B y C en la especificación de los estambres. Se ha visto que en los triple mutantes *sep1 sep2 sep3*, todos los órganos florales se convierten en sépalos (Theißen et al., 2016). Además, se analizó la expresión de *VviAPI*, gen que regula la identidad del meristema floral y corresponde a un gen homeótico de clase A, que regula la especificación de sépalos y pétalos (Ó'Maoiléidigh et al., 2014; Theißen et al., 2016). Concordante con la función asociada a este gen, presentó un máximo de expresión temprana en

el estadio 12, y descendió de forma gradual a partir del estadio 13 hasta el estadio 19 (**Figura 6**). En la investigación de Palumbo et al., (2019) se observó un alto nivel de expresión de *VviAPI* en el cáliz y en la caliptra, sépalos y pétalos, respectivamente. Por otra parte, resulta de interés, que la región promotora de *VviPSZ3* pareciera estar regulada por *VviAPI* y *VviFUL2*, puesto que presenta sitios de interacción con estos factores de transcripción en su región promotora (González, 2013; Tesis doctoral).

En este estudio se evaluaron varios genes descritos en *Arabidopsis*, que participan de la especificación de la antera: *EMS1*, *SERK1*, *BAMI* (*GEA*); y genes descritos en la formación del grano de polen: *DYT1*, *MYB33*, *AMS*, *MYB80* y *MS* (*GPM*) (**Figuras 7 y 8**). *EMS1* (también llamado *EXS*; *EMS1/EXS*) codifica para un putativo receptor quinasa con repeticiones ricas en serina, treonina y leucina (LRR) asociado a la diferenciación de los microsporocitos y las células del *tapetum*, por lo cual se ha descrito participando del destino de las células reproductoras y las células somáticas adyacentes (Canales et al., 2002; Zhao et al., 2002). Por lo tanto, la expresión de este gen estaría posicionada temprano dentro de la red de regulación del desarrollo del polen en *Arabidopsis* (Gómez et al., 2015). Concordante con lo descrito, en este trabajo se observó una expresión temprana de *VviEMS1* teniendo un máximo de expresión en el estadio 12, luego descendiendo levemente en el estadio 13, y manteniendo una expresión moderada en el estadio 14 (**Figura 7**). En los siguientes estadios, la expresión fue muy baja, lo que sugiere que este gen podría estar involucrado en el desarrollo de la antera en la vid, al igual que en *Arabidopsis*.

Otros genes descritos en la especificación de la antera son *SERK-1/SERK2*, los cuales codifican para *leucine-rich repeat receptor-like protein kinases* (LRR-RLK) y tienen función redundante en la diferenciación celular y el desarrollo temprano del *tapetum* (Albrecht et al., 2005; Gómez et al., 2015). En esta tesis se analizó la expresión de *VviSERK1*, el cual mostró expresión alta desde el estadio 12 al estadio 15 y moderada en los estadios 16 y 17 (**Figura 7**). *VviSERK1* tuvo su máxima expresión en el estadio 12, a partir del cual comenzó a bajar gradualmente. En *Arabidopsis* se han descrito cinco miembros de la familia *SERK* (*SERK1-SERK5*), los cuales se han caracterizado participando en diversos eventos del desarrollo, tales como, la señalización de brasinoesteroides, el control de la muerte celular, la patogénesis y el desarrollo de anteras y polen (Albrecht et al., 2005; Colcombet et al., 2005; Wu et al., 2015). En particular, *SERK1* se ha caracterizado por estar participando de la separación de órganos en

flores, además de estar involucrados en la esporogénesis masculina (Lewis et al., 2010; Wu et al., 2015). Por lo que este gen en cv. Carménère podría estar participando, además, del desarrollo de la antera, en diferentes estadios del desarrollo del grano de polen.

Por otra parte, se evaluó el gen *VviBAM1*, este gen mostró una expresión moderada y constante entre los estadios 12 y 17, para luego decaer en los estadios 18 y 19. *BAM1* y *BAM2* también codifican para LRR-RLKs y tienen función redundante durante el desarrollo temprano de la antera (Hord et al., 2006). Estos dos genes controlan la diferenciación de las células parietales para la formación del *tapetum*, las células de la capa media y el endotecio (Hord et al., 2008; Gómez et al., 2015). Los patrones de expresión de *BAM1/2* en *Arabidopsis*, muestran una expresión temprana, promoviendo la formación de las células parietales primarias y una función posterior en las PMCs (Hord et al., 2008). Se ha visto también que *BAM1/2* estarían involucrados en el desarrollo del gametofito femenino (DeYoung et al., 2006). Estos resultados sugieren que *VviBAM1* en la vid Carménère, estaría asociado no solo al desarrollo de la antera, sino que también a funciones tardías durante el desarrollo del grano de polen, mostrando un patrón de expresión diferente al observado en *Arabidopsis*.

Luego se evaluaron genes que han sido descritos en la formación del grano de polen maduro, el primero de ellos fue *DYTI*, el cual codifica para un factor de transcripción *helix-loop-helix* (bHLH), que actúa río abajo de *EMS1/EXS*, y es esencial para la expresión de genes del *tapetum* (Zhang et al., 2006; Gómez et al., 2015). *VviDYTI* mostró un alto nivel de transcritos entre los estadios 12 y 16, alcanzando el máximo de expresión en el estadio 14 (**Figura 8**). Se ha descrito en *Arabidopsis* que *DYTI* activa la expresión de diversos genes que codifican para otros bHLH. Estos genes están altamente expresados en el *tapetum* de las anteras. *DYTI* se localiza en el citoplasma y el núcleo en el estadio 5, y específicamente en el núcleo en la etapa 6 del desarrollo de las anteras en *Arabidopsis* (Sanders et al., 1999; Zhu et al., 2015; Cui et al., 2016). Entre los estadios 5 y 7 las PMCs evidencian meiosis y producen tétradas de microsporas haploides (Sanders et al., 1999). En consecuencia, y dado los niveles de expresión de *VviDYTI* en el cv. Carménère, este gen estaría involucrado en el desarrollo del grano de polen en Carménère, con un patrón de expresión similar a lo mostrado en *Arabidopsis*.

Posteriormente se evaluó a *VviMYB33*. *MYB33* tiene función redundante con *MYB65* facilitando el desarrollo del *tapetum* alrededor de la etapa de meiosis (Millar and Gubler, 2005; Liu and Fan, 2013). Se ha establecido que *MYB33* y *MYB65* podrían formar heterodímeros con *DYT1* para regular la expresión de genes del *tapetum*. En el presente trabajo, la expresión de *VviMYB33* mostró un aumento gradual de la expresión a partir del estadio 13 al estadio 16, donde alcanzó la máxima acumulación de transcritos (**Figura 8**). En los estadios posteriores la expresión descendió gradualmente. En consecuencia, y de acuerdo a los estadios del desarrollo del grano de polen identificados en la presente tesis, es posible sugerir que en la vid cv Carménère, este gen estaría involucrado en procesos del desarrollo reproductivo posteriores a lo observado en *Arabidopsis*.

Adicionalmente se evaluó a *VviAMS*, el cual mostró una expresión alta a partir del estadio 13 en adelante, alcanzando el máximo de expresión en el estadio 14 para luego bajar gradualmente (**Figura 8**). *AMS* es un bHLH y tiene un importante rol en etapas tempranas del desarrollo del polen, al igual que es un regulador importante de la formación de la pared del polen, regulando varios genes involucrados en el proceso (Ferguson et al., 1998; Xu et al., 2014; Lou et al., 2018). Se ha reportado que *AMS* presenta bajo nivel de expresión en anteras pre-meióticas e incrementa post-meiosis (Sorensen et al., 2003). De acuerdo al modelo descrito en *Arabidopsis*, este gen estaría participando en el desarrollo del grano de polen en la vid Carménère, con un patrón de expresión similar a lo descrito en dicha especie modelo.

Por su parte, *MYB80* (*MYB103/MS88*) codifica para una proteína MYB R2R3, se expresa en microsporas entre los estadios 6 y 10 del desarrollo de la antera (Phan et al., 2011). Se ha descrito que entre los estadios 9 y 12 se diferencian los granos de polen tri-celulares (Sanders et al., 1999). Los resultados del presente estudio mostraron que *VviMYB80* se expresa moderadamente en el estadio 14, y tiene una alta expresión entre los estadios 15 y 17, con un máximo en el estadio 15 (**Figura 8**). Se ha descrito que *MYB80* desempeña un rol importante en el desarrollo del *tapetum*, la disolución de la calosa y la formación de exina (Zhang et al., 2007). De acuerdo a los resultados observados en esta tesis, se puede inferir que este gen estaría implicado en el desarrollo del grano de polen, en estadios tardíos en la vid Carménère.

Finalmente, *VviMS1* mostró un alto nivel de transcritos entre los estadios 15 y 17, bajando la expresión en el estadio 18, en comparación con los estadios anteriores, aunque de igual forma la expresión en el estadio 18 es elevada. *MS1* es un factor de transcripción *Plant Homeodomain (PHD)-finger*, esencial para la formación de la pared del polen y la muerte celular programada del *tapetum* (Gómez et al., 2015; Yang et al., 2007). En *Arabidopsis* se ha determinado que este gen está activo durante las últimas etapas del desarrollo de la microspora con expresión en el *tapetum* (Wilson et al., 2001). Los resultados de esta tesis, muestran que este gen tendría una participación tardía durante el desarrollo reproductivo de la vid *Carménère*, sin embargo, no se relacionaría con lo descrito en *Arabidopsis* (Wilson and Zhang, 2009; Gómez et al., 2015).

En relación a los genes evaluados que estarían involucrados en la microgametogénesis (**Figura 9**), se pudo observar que *VviFBL17* presentaron alta expresión entre los estadios 12, 13 y 14 y moderada expresión en los estadios 15, 16 y 17 (**Figura 9**). En *Arabidopsis* *FBL17* participa de la regulación del ciclo celular durante el desarrollo del polen, siendo esencial para la progresión de PMII (Gusti et al., 2009). Pero también se ha determinado que su función no se limita exclusivamente a la gametogénesis masculina (Noir et al., 2015). Además, *FBL17* es regulado positivamente por el factor de transcripción *E2FA*, promoviendo la entrada a fase S del ciclo celular (Gusti et al., 2009). Contrario a los que se podía esperar, en el presente trabajo se observó que la expresión de *VviE2FA* mantuvo una expresión baja y constante entre los estadios 12 y 15 y luego incrementó en los estadios 16 y 17, presentando una expresión moderada en ambos estadios, donde presentó el máximo de expresión (**Figura 9**). Por su parte, *FBL17* dirige la degradación de los inhibidores de *CDKA;1* que también es esencial para la PMII (Iwakawa et al., 2006; Zhao et al., 2012). En esta tesis, no se observó un patrón diferencial en la expresión de *VviCDKA;1*, el cual mostró bajo nivel de expresión y constante en todos los estadios evaluados. Recientemente, se ha visto en *Arabidopsis* que *CDKA;1* no solo sería un regulador de la mitosis, sino que también de la meiosis (Sofroni et al., 2020; Yang et al., 2020). Con estos antecedentes, no es posible determinar el papel de los genes asociados a la microsporogénesis en *Arabidopsis*, en el desarrollo reproductivo de la vid *Carménère*, por lo cual se requieren más experimentos para tener claridad de su función en esta especie.

6.3 La expresión de *VviPSZ3* es dinámica durante el desarrollo de la inflorescencia en la vid cv. Carménère.

Los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de anteras y polen en *V. vinifera* son poco conocidos a la fecha. Como se ha visto hasta ahora, en especies modelos como *Arabidopsis*, la red de regulación del grano de polen se encuentra bien caracterizada (Gómez et al., 2015). En la vid se ha descrito a *VviPSZ3* como un putativo factor de transcripción del tipo C₂H₂-ZF, cuya función aún es desconocida (González, 2013; Tesis doctoral), y se cree que estaría participando en el desarrollo del polen y las semilla en la vid cv. Carménère (González, 2013; Tesis doctoral). En este trabajo se analizó la expresión de *VviPSZ3*, el cual mostró un patrón de expresión dinámico durante el desarrollo de la inflorescencia en la vid cv. Carménère, observando dos puntos de máxima expresión: en el estadio 15 y 18 del sistema E-L (**Figura 10**). Esto resulta de interés, puesto que previamente se ha descrito que *VviPSZ3* presenta expresión en polen y semillas (González, 2013; Tesis doctoral). Recientemente se describió un C₂H₂-ZFP denominado *BrZFP38* cual se expresa en polen maduro y en estadios posteriores, durante la polinización y fertilización (Lyu et al., 2020). Estos antecedentes sugieren que *VviPSZ3*, al igual que *BrZFP38* de *Brassica rapa* subsp. *Chinensis*, tendría dos momentos claves en el desarrollo reproductivo de la vid: durante la maduración del grano de polen y en momentos posteriores en los eventos de polinización y fertilización, sin embargo, se requiere de análisis en estadios posteriores del desarrollo de la inflorescencia, para identificar su putativa participación, durante los eventos asociados a la doble fecundación, así como también durante el desarrollo del embrión y semilla. Por otra parte, *VviPSZ3* presenta alta similitud con otras proteínas caracterizadas en el desarrollo reproductivo. Un ejemplo es *Pethy;ZPT3-3* de *P. hybrida*, el cual estaría participando del desarrollo reproductivo femenino de petunia, expresándose específicamente en el tejido transmisor del estilo y en la zona secretora del estigma a través de la cual crecen los tubos polínicos, por lo cual, se cree que este C₂H₂-ZF podría estar relacionado con la conductancia del tubo polínico (Kubo et al., 2000; Kubo and Takatsuji, 2007). Por otra parte, en petunia se han descrito otros C₂H₂-ZFP, involucrados en el desarrollo del grano de anteras y polen, los cuales se expresan de forma secuencial durante la progresión del desarrollo del tejido reproductor masculino (Kobayashi et al., 1998). Algunos de estos genes han sido bien caracterizado en el desarrollo de anteras y polen, tales como, *MEZ1* y

TAZI (Kapoor et al., 2002; Kapoor and Takatsuji, 2006). (Kubo et al., 2000; Kubo & Takatsuji, 2007).

6.4 *Atzat4* (+/-) muestra defectos en la línea germinal masculina.

Los ZFP desempeñan un rol fundamental en diversas funciones celulares y se han reportado como una de las familia más abundante de reguladores transcripcionales en *A. thaliana* (Englbrecht et al., 2004; Ciftci-Yilmaz and Mittler, 2008). En *Arabidopsis* se han descrito nueve familias de ZFP, una de ellas es la del tipo C₂H₂, la cual tiene 176 miembros (Xie et al., 2019). Los ZFP del tipo C₂H₂ se han descrito participando en diferentes procesos, tales como remodelamiento de la cromatina, procesos metabólicos del ARN y en respuesta al estrés y el desarrollo (Englbrecht et al., 2004; Xie et al., 2019).

En el presente estudio se caracterizó fenotípicamente un mutante heterocigoto, *Atzat4* (+/-), puesto que previamente se había descrito que el mutante homocigoto no sería viable (González, 2013; Tesis doctoral). De interés resultó evaluar en el mutante, características que tuvieran relación con el desarrollo reproductivo, específicamente en la línea germinal masculina y en la fertilidad, para determinar la putativa función de AtZAT4.

El estudio de la línea germinal masculina incluyó el análisis de la viabilidad de los granos de polen, para lo cual se utilizó la técnica de Alexander modificada (Peterson et al., 2010). Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre el número de granos de polen viables en *Atzat4* (+/-), comparado con el WT. Sin embargo, al evaluar la germinación y elongación del tubo polínico, se observó una reducción significativa para ambas características (**Figura 11**). La determinación de la viabilidad de los granos de polen, a través de tinción Alexander, permite determinar la presencia o ausencia del citoplasma, lo cual indica esterilidad o madurez de los granos de polen (Alexander, 1969; Impe et al., 2020). Por otra parte, la germinación del grano de polen y la elongación del tubo polínico son esenciales para el éxito de la reproducción sexual. Una incorrecta germinación y elongación del tubo polínico, pueden indicar defectos durante el desarrollo de anteras y polen, como también durante la maduración del mismo (Steinhorst and Kudla, 2012).

AtZAT4, al igual que otros C₂H₂-ZFP asociados al desarrollo del polen, pertenece a la subclase *CI-3i* de la familia C₂H₂-ZFP, y se encuentra anotado con una función de respuesta al estrés (Englbrecht et al., 2004; Xie et al., 2019). Además, este C₂H₂ ZF presenta un motivo de represión EAR y una alta similitud con VviPSZ3 de la vid (González, 2013; Tesis doctoral), resultando de interés caracterizar su función. Dentro de la subclase *CI-3i*, encontramos a AtDAZ1 y AtDAZ2, los cuales son necesarios para la división mitótica de las células germinales, para una adecuada acumulación de las ciclinas y para que ocurra una fecundación exitosa. Además, presentan dos motivos EAR que funcionan como represores transcripcionales en la línea germinal masculina (Borg et al., 2014; Xie et al., 2019).

Los resultados de la germinación y elongación *in vitro* del mutante *Atzat4* (+/-) revelaron defectos en la línea germinal masculina críticos, puesto que ambas características son esenciales para la doble fecundación. La función primaria del grano de polen es entregar las células espermáticas al gametofito femenino, para lo cual se debe llevar a cabo una correcta polinización y crecimiento del tubo polínico (Selinski and Scheibe, 2014). El tubo polínico se origina a partir de la célula vegetativa, la cual germina, y generalmente, emerge por aberturas del grano de polen (Shi and Yang, 2010). Diversos estudios han demostrado como el desarrollo anormal del grano de polen conduce a una reducida germinación y elongación del tubo polínico. Se ha descrito que la pérdida de función, de diferentes C₂H₂-ZF, conduce a una reducida capacidad germinativa (Kapoor et al., 2002; Han et al., 2018; Lyu et al., 2019).

TAZ1 de petunia es un factor de transcripción del tipo C₂H₂-ZF con tres dominios de este tipo, el cual se ha descrito como esencial en el desarrollo del *tapetum* y la maduración del grano de polen (Kapoor et al., 2002). Las células tapetales interactúan de forma compleja y bidireccional con las PMCs, actuando como tejido nutritivo de estas células, pero además provee de los materiales para la formación de la compleja pared del polen (Scott et al., 2004; Zhang and Yang, 2014). En líneas silenciadas de *TAZ1* se observó una reducida germinación *in vitro* y semi-*in vivo*, y aquellos tubos que germinaban crecían no más de 80 μm (Kapoor et al., 2002). Otro factor de transcripción con tres C₂H₂ ZF y similar a TAZ1, implicado en el desarrollo del *tapetum* es BcMF20 de *B. campestrestris*. Mutantes *bcmf20* mostraron una escasa germinación, mostrando que menos del 20% de los granos de polen germinaba (Han et al., 2018). Pero no solo se han descrito C₂H₂ ZFP implicados en el desarrollo del *tapetum*, sino que también durante

la formación de la pared del grano de polen. MAZ1 es un C₂H₂-ZFP de *Arabidopsis* que presenta dos dominios C₂H₂-ZF, y desempeña un importante rol en la formación normal de *primexina* y el desarrollo de la microspora, por lo tanto, es esencial para la formación de la pared del grano de polen y la fertilidad del mismo (Lyu et al., 2019). La formación de la pared del grano de polen, está dentro de la maduración que sufre este, antes de la dehiscencia de la antera y es esencial para la supervivencia, la interacción con el gametofito femenino, la germinación y el crecimiento tubular (Shi and Yang, 2010). En plantas *maz1* se observó una reducida tasa de germinación *in vivo* y se observó un menor número de tubos polínicos al compararlos con el WT (Lyu et al., 2019). Lyu et al., (2020) caracterizó diversos C₂H₂-ZFP en *B. rapa*. Uno de ellos, BrZFP38 presenta dos motivos EAR y funcionalidad durante el desarrollo de la línea germinal masculina. *BrZFP38* mostró alta expresión en polen maduro y en tubos polínicos en germinación. Análisis del mutante heterocigoto *CR-17* mostró reducida viabilidad, por tinción Alexander, en granos de polen aberrantes. Por tinción DAPI observaron que los granos de polen aberrantes no presentaban núcleo. Además, al hacer análisis de germinación *in vitro*, se observó una reducida germinación; y para aquellos granos de polen que germinaban, presentaron anomalías en la morfología del tubo polínico.

Estos antecedentes sugieren que AtZAT4, al igual que en diversas C₂H₂-ZFP descritas, tiene un papel crítico durante el desarrollo del grano de polen. Por esta razón, la pérdida de función conduce a un desarrollo anormal del grano de polen, lo cual produce defectos en la germinación y elongación del tubo polínico, desencadenando problemas en los procesos asociados a la reproducción sexual y el éxito reproductivo en *Arabidopsis*.

6.5 *Atzat4* (+/-) muestra defectos en la fertilidad.

La reproducción sexual en angiospermas se caracteriza por un proceso de doble fertilización, la cual conduce a la formación de las semillas y frutos, donde a partir del óvulo se forma la semilla y del carpelo circundante (y en algunas especies otros órganos florales), se diferencia el fruto (Vivian-Smith et al., 2001). En estudios previos, donde se había dado indicios de la posible funcionalidad de *Atzat4* (+/-) se había observado que este genotipo mostraba un

reducido número de semillas por silicuas, al ser comparado con el WT. Ello sugeriría una posible funcionalidad en el desarrollo reproductivo de esta ZFP, además de la letalidad del mutante homocigoto, que demostró un rol esencial durante el desarrollo de *A. thaliana* (González, 2013; Tesis doctoral). En el presente trabajo se evaluó la fertilidad, cuantificando el número de semillas por silicuas completas no dehiscentes, para lo cual se realizó la decoloración del fruto. Los resultados mostraron una significativa reducción en el número de semillas en *Atzat4* (+/-) al ser comparadas con el WT. Además, al evaluar el tamaño de las silicuas de *Atzat4* (+/-), estas presentaron una longitud inferior al tamaño de las silicuas en el WT (**Figura 12**). Esto demuestra que la reducción en la funcionalidad de AtZAT4 altera, no solo a la línea germinal masculina, sino que se ve reducida también la fertilidad en *A. thaliana*. En el trabajo de Borg et al., (2014), el doble mutante *daz1-1^{+/-} daz2-1^{-/-}* en *Arabidopsis* mostró una alta proporción de óvulos no fertilizados, y por lo tanto, un menor número de semillas desarrolladas al ser comparado con el WT. En el trabajo de Lyu et al., (2019), el mutante *maz1* de *Arabidopsis* mostró un tamaño de silicua normal, sin embargo, presentaban óvulos no fertilizados, además de un reducido número de semillas al compararlo con el WT. Además, en MEZ1 de petunia, otro factor de transcripción del tipo C₂H₂-ZF, esencial para la progresión de meiosis masculina, mostró en líneas silenciadas para este gen, que el tamaño del fruto y el número de semillas en desarrollo fueron aproximadamente 1/3 que en el WT (Kapoor and Takatsuji, 2006). Igualmente, en *CR-17*, el mutante del gen *BrZFP38* de *B. rapa*, se observó un tamaño pequeño de las silicuas, con una reducida formación de semillas (Lyu et al., 2020). Estos resultados dan indicios de la posible participación de AtZAT4 durante la formación de semillas en *A. thaliana*, puesto que muestra semejanzas a lo descrito previamente en literatura.

Con los resultados anteriores, se evaluó si las semillas que se formaban en *Atzat4* (+/-) presentaban desarrollo del embrión viable, a través del test TZ, en el cual el cloruro de tetrazolio es incoloro y se reduce por acción de deshidrogenasas a formazán, de color rojo carmín. Por lo tanto, este test es un indicador de reacciones de óxido-reducción, donde el color rojo de un tejido específico indica la presencia de procesos respiratorios activos (Porter et al., 1946; Verma and Majee, 2013). Los resultados mostraron que la tasa de semillas viables en *Atzat4* (+/-) era significativamente más reducida que en el WT, sumado a que la germinación de las semillas también se veía disminuida en el mutante (**Figura 13**). Si bien, estos ensayos permiten

determinar la presencia de embriones viables e inviables de forma indirecta, se requieren más estudios para determinar si existen defectos en el desarrollo de los mismos. Para analizar el rol de DAZ1/DAZ2 en la fertilidad, se realizaron estudios del efecto en doble mutante *daz1-1^{+/-} daz2-1^{-/-}* en *Arabidopsis*. Los resultados demostraron que al realizar cruza con el polen del doble mutante, en pistilos macho estériles, no ocurría fertilización de la ovocélula ni de la célula central, a diferencia del WT donde se observaba el embrión y el endospermo, como resultado de la doble fertilización, lo cual lleva a concluir que estos factores de transcripción, además de tener una función esencial durante el desarrollo del grano de polen, también son importantes durante la formación de las semillas (Borg et al., 2014). Además, en el mismo trabajo se evaluó el destino del gameto de *daz1-1^{+/-} daz2-1^{-/-}* en ensayos semi-*in vivo* y se observó que no ocurría fertilización de la ovocélula ni de la célula central (Borg et al., 2014). Para el caso de MEZ1 se evaluó en la línea silenciada el desarrollo del embrión, las cuales presentaron un desarrollo incompleto, el cual alcanzó el estadio globular tardío o en forma de corazón (Kapoor and Takatsuji, 2006).

El reducido número de semillas por silicuas y reducido tamaño del fruto en *Atzat4 (+/-)*, sumado a que las semillas presentaron menor viabilidad y tasa de germinación, permiten sugerir una putativa función durante el desarrollo de las semillas de AtZAT4.

6.6 VviPSZ3 de *V. vinifera* cv. Carménère corrige el fenotipo del mutante *Atzat4* de *A. thaliana*.

VviPSZ3 presentan una alta similitud de secuencias con PhZPT3-3 de petunia y con SIZPT3-1 de *S. latifolia*, ambos factores de transcripción se han descrito participando del desarrollo reproductivo (González, 2013; Jenkins et al., 2005; Kubo et al., 2000). Como ya se ha mencionado, PhZPT3-3 está implicado en el desarrollo del tejido femenino en petunia y SIZPT3-1 parece estar involucrado en el desarrollo de estambres en *S. latifolia* (Jenkins et al., 2005; Kubo et al., 2000).

VviPSZ3 presenta una alta similitud con AtZAT4, mostrando tres dominios C₂H₂ ZF y un motivo de represión EAR. Además, las regiones promotoras de ambos genes también son

similares, mostrando diversos sitios de regulación compartidos en ambos promotores (González, 2013; Tesis doctoral). Interesantemente, estudios previos habían descrito que en el mutante *Atzat4* (+/-) se reducía el número de semillas por silicua (González, 2013; Tesis doctoral; Caris, 2015; Tesis de pregrado). Sumado a las similitudes que presentan *VviPSZ3* y *AtZAT4*, se evaluó si el fenotipo mutante que se había previamente descrito para *Atzat4* (+/-) se corregía al expresar *VviPSZ3*, mostrando que se recuperaba el número de semillas por silicua (Caris, 2015; Tesis de pregrado; González, 2013; Tesis doctoral). Con estos antecedentes sumado a los resultados obtenidos para la caracterización de *Atzat4* (+/-), se procedió a determinar si el fenotipo mutante se corregía por acción de *VviPSZ3*.

En *Atzat4* (+/-) se observó defectos en la línea germinal masculina con una reducida germinación y elongación del tubo polínico en condiciones *in vitro*. Es así como se realizó el análisis de ambos caracteres en plantas transgénicas con la construcción *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*. Se pudo observar que la germinación y elongación del tubo polínico de las plantas transgénicas, era equivalente a los resultados obtenidos para el WT (**Figura 15**). Además, como *Atzat4* (+/-) presentó una reducida fertilidad, con un reducido número de semillas por silicua y un tamaño de la silicua menor al WT, se evaluó estos caracteres en las plantas transgénicas, demostrando que las plantas *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*, mostraron un número de semillas y tamaño de la silicua equivalente al WT (**Figura 16**). Finalmente, las tasas de viabilidad y germinación de las semillas en las plantas *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* se corregían, donde las plantas transgénicas y el WT no exhibieron diferencias significativas (**Figura 17**), por lo cual nuevamente se corrigió el fenotipo observado en *Atzat4* (+/-). Con estos resultados se puede sugerir que *VviPSZ3* y *AtZAT4* presentan funciones similares en la vid y *Arabidopsis*, respectivamente, dando los primeros indicios de la funcionalidad de ambos factores de transcripción. Sin embargo, aún faltan más experimentos que permitan comprobar que estos factores de transcripción son ortólogos.

En la vid, pocos estudios han caracterizado C₂H₂-ZFPs y es más desconocido aún, aquellos que estarían implicados en el desarrollo reproductivo. *VvZFP11* fue descrito por (Yu et al., 2016) como un factor de transcripción del tipo C₂H₂-ZFP que presenta dos dominios C₂H₂-ZF, un motivo EAR y un L-box; el cual estaría involucrado en la respuesta de defensa en la vid, y es desconocido un posible rol en procesos del desarrollo. En un trabajo reciente se caracterizó

a *VviSUP-like* de *V. vinifera* cv. Xiangfei (Liang et al., 2020). En *Arabidopsis* SUP se ha descrito como un C₂H₂-ZF con un dominio de represión EAR esencial para la especificación adecuada del límite entre los estambres en el verticilo 3 y los carpelos en el verticilo 4 (Prunet et al., 2017). Además, SUP participa de la morfogénesis de los órganos, controlando la formación de los primordios de estambres, óvulos y carpelos (Hellens et al., 2005; Breuil-Broyer et al., 2016). *VviSUP-like* regularía negativamente el desarrollo de los carpelos, inhibiendo la expresión de *VviAG1* y *VviWUS* (*VviWUSCHEL*) (Lenhard et al., 2001; Liang et al., 2020). Recientemente, se identificó a dos C₂H₂-ZF en la vid, *VviZFP13* y *VviZFP68*, los cuales podrían estar participando del desarrollo del polen en esta especie (Arrey-Salas et al., 2021). *VviPSZ3*, es un nuevo C₂H₂-ZFP caracterizado en la vid, que tendría participación del desarrollo de polen y semillas.

6.7 Los promotores de *VviPSZ3* y *AtZAT4* muestran similar actividad durante el desarrollo floral.

En el trabajo realizado por González (2013; Tesis doctoral), se describió a los promotores de *VviPSZ3* y *AtZAT4* con similares elementos en *Cis*, destacando aquellos implicados en la interacción con reguladores del desarrollo floral, y los de expresión específica en polen y en semillas. Además, los resultados del presente estudio, demostraron una similar actividad de *VviPSZ3* y *AtZAT4* en el desarrollo de polen y semillas, donde la actividad de *VviPSZ3*, corrige el fenotipo del mutante *Atzat4* (+/-). Por esta razón, se realizó el análisis de la actividad GUS, cualitativamente, en plantas de tabaco transformadas con los promotores de *VviPSZ3* y *AtZAT4*: *promVviPSZ3::GUS* y *promAtZAT4::GUS*. Los resultados mostraron una actividad histoquímica similar para ambas construcciones, donde se observó la mayor tinción GUS en las anteras de los estambres y en los sépalos (**Figura 18**). También se observó tinción en el estigma y pétalos, pero con menor intensidad. Esto demuestra que ambos promotores tienen actividad similar durante el desarrollo de la flor en vid y *Arabidopsis*. De acuerdo a lo descrito previamente en tabaco, el tamaño del botón floral es un indicador del estado del desarrollo del grano de polen, donde se ha establecido que flores recién abiertas, de aproximadamente 40-45 mm, presentan granos de polen completamente maduros (Chuprov-

Netochin et al., 2016). Las flores teñidas en este trabajo presentaban dichas características, por lo cual se contaba con anteras no dehiscentes desarrolladas y polen maduro.

6.8 Genes asociados al desarrollo de polen y semillas en *A. thaliana* muestran patrones de expresión diferencial en el mutante *Atzat4* (+/-).

A través del análisis de GO se pudo determinar que diversos genes que están asociados al desarrollo reproductivo en *Arabidopsis*, se regulan positiva o negativamente en botones florales de *Atzat4* (+/-) al ser comparados con el WT (**Figura 19A-19B**). De acuerdo al análisis de la expresión diferencial obtenida del RNA-seq, se pudo identificar varios genes que podrían estar implicados la maduración del grano de polen que eran regulados negativamente (*GDP*), especialmente aquellos asociados al desarrollo de la cubierta del grano de polen (**Figura 20**). Dentro de estos genes, habían miembros de la familia de pequeñas proteínas ricas en cisteína similares a la PCP (AT3G42473, AT3G07005, AT3G06985, AT3G43505, AT4G30070) las cuales son encontradas en miembros de la familia *Brassicaceae*, incluyendo *Arabidopsis* (Wang et al., 2017). La cubierta de polen, también se denomina trifina o *pollenkitt*, es una matriz extracelular, formada por una mezcla compleja de lípidos, proteínas, glico-conjugados y pigmentos, derivados del *tapetum*, la cual se deposita en la superficie externa del grano de polen, relleno los espacios y cavidades de la exina (Rejón et al., 2016; Wang et al., 2017). Esta cubierta protege al grano de polen de la deshidratación, pero además le confiere propiedades adhesivas, proporciona un conducto para que el agua pase desde el estigma, para efectuar la hidratación del polen y es importante para la comunicación polen-estigma, puesto que lleva pequeños compuestos de señalización que determinan la compatibilidad (Shi et al., 2015; Rejón et al., 2016; Wang et al., 2017). Las proteínas presentes en la cubierta del polen, en su mayoría son sintetizadas en el *tapetum* y otras proteínas de la cubierta se sintetizan tanto en células tapetales como en microsporas (Rejón et al., 2016). En *Brassica oleracea* se han descrito 30 a 40 genes PCP, uno de estos es PCP-A1, el cual tiene un máximo de expresión en el estado tricelular del polen. Además, en la misma especie se identificó un segundo gen PCP, llamado PCP1 (Doughty et al., 1998; Rejón et al., 2016). Otras PCP es miembros del género *Brassica* han sido descritas (Hiscock et al., 1995; Takayama et al., 2000).

Asimismo, se identificaron varios genes que han sido asociados y/o caracterizados en diferentes momentos del desarrollo del grano de polen (*GDP*). Entre ellos AT4G13890, que si bien no se encuentra caracterizado, al realizar un mutante insercional *Ds*, fue clasificado dentro de los mutantes que mostraron defectos durante el desarrollo y maduración del polen (Boavida et al., 2009). Además, se identificó que *MS2* (*Male Sterile2*; AT3G11980) también era regulado negativamente. *MS2*, que actúa río debajo de MYB80 y codifica para una acil graso – proteína portadora de acilos (ACP) reductasa, la cual es esencial para la síntesis de exina y por lo tanto, para la formación de la pared del polen (Chen et al., 2011; Liu and Fan, 2013). Además, también se encuentra regulado negativamente *MS1* (AT5G22260), el cual, como se describió previamente, es esencial para para la formación de la pared del polen y la muerte celular programada del *tapetum* (Gómez et al., 2015; Yang et al., 2007). Tanto *MS1* como *MS2*, también estarían involucrados en el desarrollo de la cobertura del polen (Liu and Fan, 2013). La regulación negativa de estos genes también indica que AtZAT4 estaría regulando genes asociados al desarrollo y maduración del grano de polen (**Figura 20 y Tabla S3**).

También, se identificaron genes que son blancos directos de DUO1 (DUO1 POLLEN1), regulándose negativamente (*GDP*). DUO1 es un factor de transcripción R2R3 MYB que desempeña un papel esencial durante la especificación de las células espermáticas, participando de la PMII (Durbarry et al., 2005; Borg et al., 2011). Se han descrito diversos genes blancos del DUO1, entre ellos *PCR11* (*PLANT CADMIUM RESISTANCE 11*; AT1G68610), gen que se expresa específicamente en células espermáticas (Borg et al., 2011). Además se identificó a *MAPKKK20* (*MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 20*; AT3G50310), otro blanco directo de DUO1 y que ha mostrado una alta expresión en las células espermáticas (Borges et al., 2008; Borg et al., 2011), el cual además de ser asociado al desarrollo y viabilidad del polen, se ha asociados con el desarrollo de semilla y frutos en *Solanum chacoense* (Gray-Mitsumune et al., 2006; O'Brien et al., 2007). Finalmente, *DAZI* (AT2G17180), blanco de DUO1, también se vio regulado negativamente en el presente estudio. Como se describió previamente, *DAZI* codifica para un C₂H₂-ZFP esencial para la PMII y el desarrollo del embrión y semillas (Borg et al., 2014) (**Figura 20 y Tabla S3**).

Por otra parte, se identificaron genes regulados negativamente, asociados al proceso de doble fecundación (*GPF*). Entre ellos hubo diversos genes que codifican para pequeños péptidos

ricos en cisteínas, similares a defensinas, denominados LURE (AT5G43513, AT5G43510, AT5G43518), los cuales son producidos por las células sinérgidas y median la correcta conductancia del tubo polínico al óvulo, los cuales han sido descritos en *Torenia fournieri* y en *A. thaliana* (Takeuchi and Higashiyama, 2016; Johnson et al., 2019). En *A. thaliana* se ha descrito que AtLURE1.2 requiere de un *pollen receptor kinase 6* (PRK6), localizado en el ápice del tubo polínico, para la precisa atracción del péptido LURE y por lo tanto, para la orientación del tubo polínico (Takeuchi and Higashiyama, 2016). En los resultados del RNA-seq, *AtPRK6* mostró una represión en el mutante al ser comparado con el WT (Datos no mostrados). Además, se observó que *AtLURE1.2* (AT5G43510), también se veía reprimido en *Atzat4* (+/-) (**Figura 20 y Tabla S3**). Esto resulta de interés, puesto que ambos genes descritos como esenciales para la conductancia del tubo polínico y que, además, interactúan directamente *in vivo*, se regulan negativamente en *Atzat4* (+/-).

Dentro de los genes asociados al desarrollo de semillas regulados negativamente, destacó *MEE65* (*MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST65*; AT2G01280), el cual codifica para *Cyclin/Brf1-like TBP-binding protein*. Este gen no ha sido caracterizado, sin embargo, se ha asociado al desarrollo del embrión, puesto que el fenotipo mutante muestra defectos en la embriogénesis (Pagnussat et al., 2005) (**Figura 20 y Tabla S3**).

En relación a los genes que fueron identificados por ser regulados positivamente, también se identificaron genes asociados al desarrollo reproductivo de *A. thaliana*, entre ellos un miembro de la familia SLR1 (AT3G05727), el cual no se encuentra caracterizado. Sin embargo, se ha visto que miembros de la familia SLR1-BP1 y SLR1-BP2, se unen con alta afinidad a una glicoproteína secretada por el estigma en *B. campestris* (Takayama et al., 2000; Rejón et al., 2016). Estos antecedentes estarían indicando que AtZAT4 estaría regulando genes asociados a estadios tardíos en el desarrollo del polen, en la maduración del polen, pero también regulando el proceso de polinización y posterior fecundación, además de regular a genes asociados al desarrollo de embrión y semillas.

6.9 VviPSZ3 regula la expresión de genes asociados al desarrollo de polen y semillas.

Dentro de los genes expresados diferencialmente en botones florales de *prom35S::VviPSZ3/Atzat4*, al ser comparados con *Atzat4 (+/-)*, y que eran regulados negativamente, se identificaron miembros de péptidos LURE (*GPF*), así como también genes asociados al desarrollo de embrión y semilla (*GDS*). Uno de ellos fue *RGE (RETARDED GROWTH OF EMBRYO1; AT1G49770)*, el cual codifica para un miembro de los factores de transcripción bHLH y se expresa específicamente en el endospermo de la semilla de *Arabidopsis* y controla el desarrollo del embrión después del estado de corazón (Kondou et al., 2008). *DAZI*, también mostró regulación negativa en *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* al ser comparado con el WT (**Figura 20 y Tablas S3-S4**).

Por otra parte, resulta de interés que al evaluar *MS1 (AT5G22260)* (Yang et al., 2007), *MS2 (AT3G11980)* (Chen et al., 2011), *PCR11(AT1G68610)* y *MAPKKK20 (AT3G50310)* (Borg et al., 2011), los cuales eran regulados negativamente en *Atzat4 (+/-)* al ser comparado con el WT (*GDP*). Estos se regulaban positivamente en *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* al ser comparado con *Atzat4 (+/-)*, lo cual podría indicar el efecto de VviPSZ3 sobre aquellos genes asociados al desarrollo del polen, que se reprimían en el mutante *Atzat4 (+/-)* (**Figura 20 y Tablas S3-S4**). Además, el análisis de GO mostró que genes asociados al desarrollo reproductivo, desarrollo del embrión y del gametofito, así como también, genes asociados al desarrollo del polen, eran esencialmente regulados positivamente, mientras que aquellos regulados negativamente mostraron estar asociados a otros procesos biológicos (**Figura 19C-19D**).

Para el gen *MYB120 (AT5G55020)* también se observó una regulación positiva. Este gen que se expresa específicamente en el tubo polínico y se ha propuesto, que el factor de transcripción codificado, estaría involucrado en la regulación de genes que participan en la recepción del tubo polínico (*GPF*) (Liang et al., 2013). También, se regulaba positivamente *INP1 (INAPERTURATE POLLEN1; AT4G22600)*, el cual estaría participando de la formación de la pared del grano de polen, específicamente, controlando la formación de las aperturas del polen. INP1 marcaría sitios específicos de aperturas en las microsporas en desarrollo (*GDP*) (Li et al., 2018). Igualmente, *ACOS5 (Acyl-CoA Synthetase 5; AT1G62940)* mostró una regulación

positiva. Éste se expresa específicamente en el *tapetum* y codifica para una acil-coA sintetasa; desempeñando un rol importante en la biosíntesis de la esporopolenina, y por lo tanto, en el desarrollo de la pared del grano de polen (*GDP*) (de Azevedo Souza et al., 2009). El gen *MYB80* (AT3G11980), que participa en la formación de la exina (Zhang et al., 2007), también tuvo una regulación positiva (*GDP*). Estos datos complementan el putativo rol de *VviPSZ3* y su putativo ortólogo *AtZAT4* en el desarrollo del grano de polen, específicamente durante la maduración de este, regulando genes que se han asociado al desarrollo de la pared del gametofito masculino. Además, se identificaron genes asociados al desarrollo del embrión y semillas (*GDS*), por ejemplo, *M17* (AT2G41260) el cual codifica para una proteína LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), las cuales se acumulan tardíamente en la embriogénesis, específicamente en células de los cotiledones, hasta dos días después de la imbibición y además se han asociado a la respuesta de estrés abiótico (Raynal et al., 1999; Hundertmark and Hinch, 2008) (**Figura 20 y Tablas S3-S4**).

Finalmente, al evaluar la lista de genes regulados diferencialmente en *prom35S::VviPSZ3/Atzat4* comparados con el WT, se pudo observar en el análisis GO que genes asociados a otros procesos biológicos tales como “respuestas de defensa”, “regulación biológica” y “señalización” se veían mayoritariamente regulados negativamente (**Figura 19E**). Sin embargo, al evaluar los genes regulados positivamente, se observan términos de GO tales como, “procesos del desarrollo y reproductivos”, “desarrollo del gametofito” y “desarrollo del saco embrionario”, entre otros (**Figura 19F**). A pesar de esto, genes asociados al desarrollo y maduración del grano de polen (*GDP*), también se vieron regulados negativamente, así como también genes asociados al desarrollo de la semilla (*GDS*). Destacando genes asociados a la formación de la cubierta del grano de polen, así como también genes que codifican para proteínas que participan de la conducción del tubo polínico, como miembros de *LURE* (AT5G43513, AT5G43510, AT5G43518) y *MYB98* (AT4G18770). Este último, *MYB98*, codifica para un factor de transcripción tipo R2R3 MYB y se expresa específicamente en las células sinérgidas, desempeñando un papel importante en la conducción del tubo polínico hacia el óvulo, activando un gran número de genes asociados, tanto para la conductancia del tubo polínico, como también en la formación del aparato filiforme de las células sinérgidas (Kasahara et al., 2005; Punwani et al., 2008). También, se identificó un gen asociado al

desarrollo de la semilla, δ -VPE (δ -Vacuolar processing enzyme; AT3G07005), este gen codifica para una proteasa y se expresa específicamente en capas celulares de la cubierta de la semilla, teniendo participación en la muerte celular del tegumento de las semillas para formar la cubierta de la semilla (Nakaune et al., 2005) (**Figura 20 y Tabla S2**).

Por otra parte, en relación a los genes regulados positivamente, también se identificaron genes asociados al desarrollo de la semilla (*GDS*), como *M17* (AT2G41260) (Raynal et al., 1999; Hundertmark and Hinch, 2008), así como también asociados al desarrollo y maduración del grano de polen (*GDS*), como por ejemplo, *CYP704B1* (AT1G69500). Este gen codifica para una ω -hidroxilasa de ácidos grasos de cadena larga, la cual es esencial para la biosíntesis de la exina, específicamente de la esporopolenina, y por lo tanto, para la formación de la pared del polen (Dobritsa et al., 2009). Asimismo, en este grupo se identificó a *ACOS5* (AT1G62940) (Wang et al., 2018). También se identificaron como genes regulados positivamente a *MS1* (AT5G22260) (Yang et al., 2007), *MS2* (AT3G11980) (Chen et al., 2011), *PCR11* (AT1G68610) (Borg et al., 2011) y *MYB80* (Zhang et al., 2007).

Con estos resultados se puede posicionar a *VviPSZ3* en el desarrollo del grano de polen en la vid cv. Carménère, con dos puntos de máxima expresión durante el desarrollo de la inflorescencia. El factor de transcripción *VviPSZ3*, estaría regulando a genes que se encuentran involucrados esencialmente en el desarrollo de la pared y cubierta del grano de polen, así como también se observó un putativo papel durante el proceso de polinización y fecundación, regulando genes que participan en dichos procesos (**Figura 21**). Además, *VviPSZ3* estaría regulando procesos del desarrollo de la semilla en la vid cv. Carménère. Se requieren de posteriores estudios para identificar el momento preciso en que *VviPSZ3* estaría participando en el desarrollo reproductivo de la vid Carménère, así como también, de su putativo ortólogo *AtZAT4*, el cual estaría ejerciendo dichas funciones en *A. thaliana*.

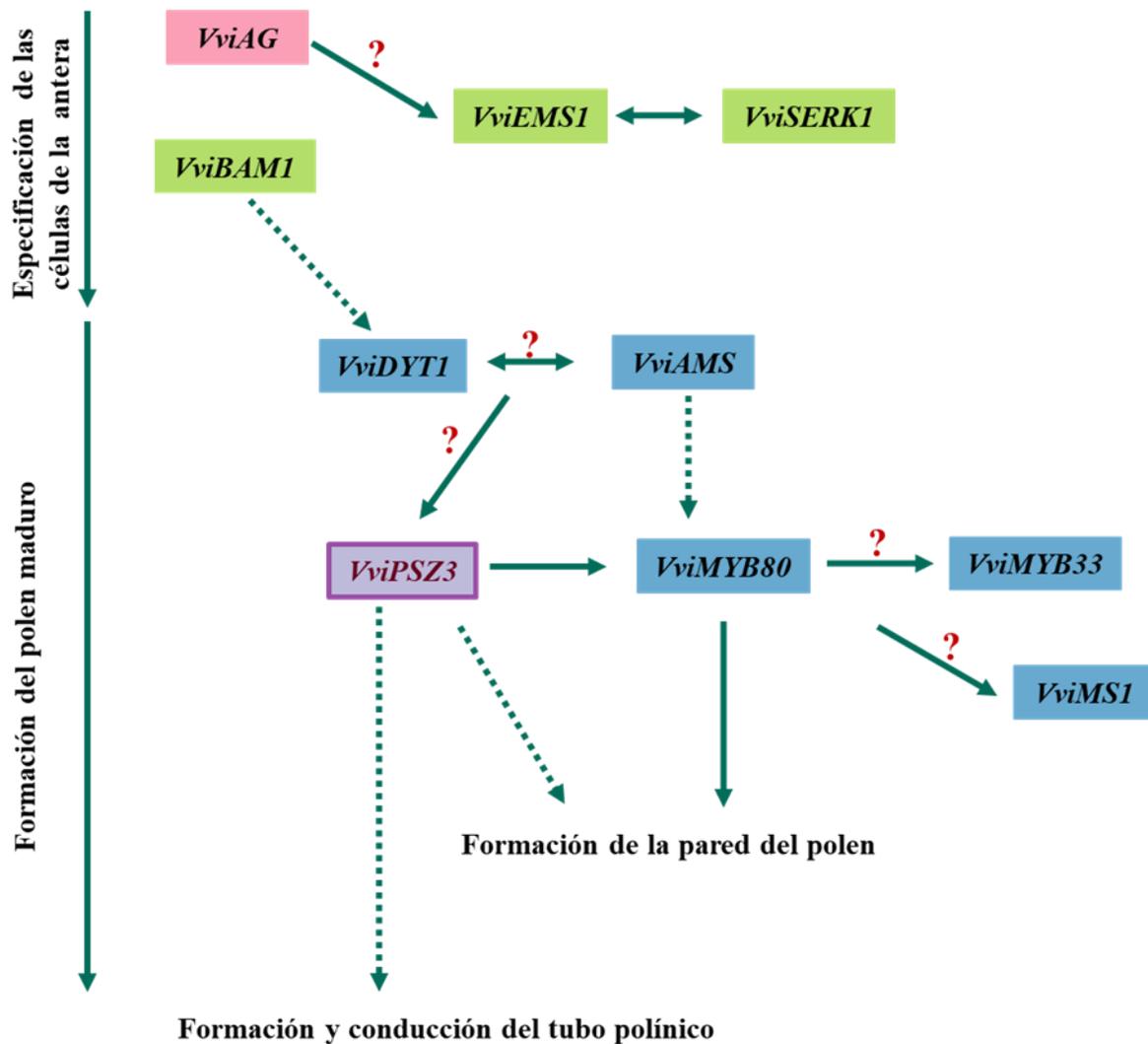


Figura 21. Modelo propuesto para la posición de *VviPSZ3* en el desarrollo del polen en *Vitis vinifera* cv. Carménère. Basado en la red de regulación génica de *Arabidopsis* (Wilson and Zhang, 2009; Gómez et al., 2015). Los signos “?” indican putativas conexiones. **Color rosa:** MADS-box clase C; **color verde:** genes de especificación de la antera; **color celeste:** genes de formación del polen maduro; **color púrpura:** *VviPSZ3*.

VII CONCLUSIONES

1. El desarrollo del grano de polen en *Vitis vinifera* cv. Carménère estaría posicionado entre los estadios 13 y 15 del sistema Eichhorn and Lorenz.
2. Los genes que codifican para factores de transcripción del tipo MADS-box de clase B (*VviAP3* y *VviPI*) y C (*VviAG*), muestran un patrón de expresión dinámico y coordinado durante el desarrollo reproductivo masculino en *V. vinifera* cv. Carménère entre los estadios 12 y 17 del sistema E-L.
3. Genes de *V. vinifera* cv. Carménère con homología a genes de la red de regulación génica de la especificación de las anteras (*GEA*) y de la formación del grano de polen maduro (*GPM*) en *Arabidopsis thaliana*, están involucrados en el desarrollo reproductivo de la vid cv. Carménère.
4. La expresión del gen *VviPSZ3* es tardía en el desarrollo y maduración del grano de polen de *V. vinifera* cv. Carménère, mostrando alta expresión en el estadio 15 del sistema E-L.
5. El mutante *Atzat4* (+/-) de *A. thaliana* reveló defectos en la línea germinal masculina, con una reducida germinación y elongación del tubo polínico. También, mostró reducida fertilidad con un menor número de semillas por silicua y un reducido tamaño del fruto. Igualmente, presentó menor viabilidad y germinación de las semillas.
6. La expresión de *VviPSZ3* en el mutante *Atzat4* corrigió los defectos en la línea germinal masculina, en relación a la germinación y elongación del tubo polínico. De igual forma, revirtió la reducida fertilidad en cuanto al número de semillas por silicua y tamaño del fruto. Al mismo tiempo, *VviPSZ3* restauró la viabilidad y germinación de las semillas.
7. Genes involucrados en el desarrollo y maduración del grano de polen (*GDP*), así como también, genes que participan en el desarrollo del embrión y de las semillas (*GDS*) son regulados por *AtZAT4* en *A. thaliana*.

8. El factor de transcripción VviPSZ3 tiene un papel importante en el desarrollo floral y frutal de *V. vinifera* cv. Carménère, ya que regula la expresión de genes involucrados en el desarrollo y maduración del grano de polen (*GDP*). Por otra parte, los resultados de esta tesis permiten sugerir una putativa participación en el proceso de polinización y fecundación (*GPF*), así como también, en la modulación de genes asociados al desarrollo del embrión y semilla (*GDS*).

VIII BIBLIOGRAFÍA

- Abreu I, Costa I, Oliveira M, Cunha M, de Castro R** (2006) Ultrastructure and germination of *Vitis vinifera* cv. Loureiro pollen. *Protoplasma* **228**: 131–135
- Agarwal P, Arora R, Ray S, Singh AK, Singh VP, Takatsuji H, Kapoor S, Tyagi AK** (2007) Genome-wide identification of C2H2 zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant Mol Biol* **65**: 467–485
- Albrecht C, Russinova E, Hecht V, Baaijens E, De Vries S** (2005) The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *Plant Cell* **17**: 3337–3349
- Alexander MP** (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol* **44**: 117–122
- Alva O, Roa-Roco RN, Pérez-Díaz R, Yáñez M, Tapia J, Moreno Y, Ruiz-Lara S, González E** (2015) Pollen morphology and boron concentration in floral tissues as factors triggering natural and GA-induced parthenocarpic fruit development in grapevine. *PLoS One* **10**: 1–18
- Anders S, Pyl PT, Huber W** (2015) HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**: 166–169
- Ariizumi T, Toriyama K** (2011) Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 437–460
- Armstrong SJ, Jones GH** (2003) Meiotic cytology and chromosome behaviour in wild-type *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **54**: 1–10
- Arrey-Salas O, Caris-Maldonado JC, Hernández-Rojas B, Gonzalez E** (2021) Comprehensive Genome-Wide Exploration of C2H2 Zinc Finger Family in Grapevine (*Vitis vinifera* L.): Insights into the Roles in the Pollen Development Regulation. *Genes* **12**: 1–24
- Baggiolini M** (1952) Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Rev Rom d'Agriculture, Vitic d'Arboriculture* **8**: 4–6
- Bate N, Twell D** (1998) Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol Biol* **37**: 859–869
- Battilana J, Lorenzi S, Moreira FM, Moreno-Sanz P, Failla O, Emanuelli F, Grandó MS** (2013) Linkage mapping and molecular diversity at the flower sex locus in wild and cultivated grapevine reveal a prominent SSR haplotype in hermaphrodite plants. *Mol Biotechnol* **54**: 1031–1037
- Becker A, Theißen G** (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol* **29**: 464–489
- Blackmore S, Wortley AH, Skvarla JJ, Rowley JR** (2007) Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol* **174**: 483–498

- Blümel M, Dally N, Jung C** (2015) Flowering time regulation in crops — what did we learn from *Arabidopsis*? *Curr Opin Biotechnol* **32**: 121–129
- Boavida LC, Shuai B, Yu HJ, Pagnussat GC, Sundaresan V, McCormick S** (2009) A collection of Ds insertional mutants associated with defects in male gametophyte development and function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **181**: 1369–1385
- Borg M, Brownfield L, Khatab H, Sidorova A, Lingaya M, Twell D** (2011) The R2R3 MYB transcription factor DUO1 activates a male germline-specific regulon essential for sperm cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 534–549
- Borg M, Brownfield L, Twell D** (2009) Male gametophyte development: a molecular perspective. *J Exp Bot* **60**: 1465–78
- Borg M, Rutley N, Kagale S, Hamamura Y, Gherghinoiu M, Kumar S, Sari U, Esparza-Franco, Manuel Sakamoto W, Rozwadowski K, Higashiyama T, et al** (2014) An EAR-dependent regulatory module promotes male germ cell division and sperm fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 2098–2113
- Borges F, Gomes G, Gardner R, Moreno N, McCormick S, Feijó JA, Becker J** (2008) Comparative Transcriptomics of *Arabidopsis* sperm cells. *Plant Physiol* **148**: 1168–1181
- Boss P, Vivier M, Matsumoto S, Dry I, Thomas M** (2001) A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to *AGAMOUS* and *SHATTERPROOF*, is not only expressed in flowers but also throughout berry development. *Plant Mol Biol* **45**: 541–553
- Boss PK, Thomas MR** (2000) Tendrils, inflorescences and fruitfulness: A molecular perspective. *Aust J Grape Wine Res* **6**: 168–174
- Bouché F, Lobet G, Tocquin P, Périlleux C** (2016) FLOR-ID: An interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **44**: 1167–1171
- Breuil-Broyer S, Trehin C, Morel P, Boltz V, Sun B, Chambrier P, Ito T, Negrutiu I** (2016) Analysis of the *Arabidopsis superman* allelic series and the interactions with other genes demonstrate developmental robustness and joint specification of male – female boundary, flower meristem termination and carpel compartmentalization. *Ann Bot* **117**: 905–923
- Callejas R, Galleguillos M, Benavides C** (2004) Pérdidas de producción por fallas en la fecundación, competencia y anormal desarrollo de las bayas en vid vinífera. 1–10
- Calonje M, Cubas P, Martínez-Zapater JM, Carmona MJ** (2004) Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiol* **135**: 1491–1501
- Canales C, Bhatt AM, Scott R, Dickinson H** (2002) *EXS*, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **12**: 1718–1727
- Cardarelli M, Cecchetti V** (2014) Auxin polar transport in stamen formation and development: how many actors? *Front Plant Sci* **5**: 1–13

- Caris C** (2015) Sobreexpresión del gen *VvPSZ3* de *Vitis vinifera* en el mutante *zat4* de *Arabidopsis thaliana*. Evaluación de su efecto mediante ensayos de complementación. Tesis de pregrado. Universidad de Talca
- Carmona MJ, Chaïb J, Martínez-Zapater JM, Thomas MR** (2008) A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *J Exp Bot* **59**: 2579–2596
- Carmona MJ, Cubas P, Calonje M, Martínez-Zapater M** (2007) Flowering transition in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Can J Bot* **85**: 701–711
- Cecchetti V, Altamura MM, Falasca G, Costantino P, Cardarelli M** (2008) Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* **20**: 1760–1774
- Chai L, Li Y, Chen S, Perl A, Zhao F, Ma H** (2014) RNA sequencing reveals high resolution expression change of major plant hormone pathway genes after young seedless grape berries treated with gibberellin. *Plant Sci* **229**: 215–224
- Chen D, Yan W, Fu L-Y, Kaufmann K** (2018) Architecture of gene regulatory networks controlling flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* **9**: 1–13
- Chen W, Yu XH, Zhang K, Shi J, de Oliveira S, Schreiber L, Shanklin J, Zhang D** (2011) *Male Sterile2* encodes a plastid-localized fatty Acyl carrier protein reductase required for pollen exine development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **157**: 842–853
- Chuprov-Netochin R, Neskorođov Y, Marusich E, Mishutkina Y, Volynchuk P, Leonov S, Skryabin K, Ivashenko A, Palme K, Touraev A** (2016) Novel small molecule modulators of plant growth and development identified by high-content screening with plant pollen. *BMC Plant Biol* **16**: 1–11
- Ciftci-Yilmaz S, Mittler R** (2008) The zinc finger network of plants. *Cell Mol life Sci* **65**: 1150–1160
- Colcombet J, Boisson-Dernier A, Ros-Palau R, Vera CE, Schroeder JI** (2005) *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *Plant Cell* **17**: 3350–3361
- Coombe BG** (1995) Growth Stages of the Grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Aust J Grape Wine Res* **1**: 100–110
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, et al** (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* (80-) **316**: 1030–1033
- Cui J, You C, Zhu E, Huang Q, Ma H, Chang F** (2016) Feedback regulation of DYT1 by interactions with downstream bHLH factors promotes DYT1 nuclear localization and anther development. *Plant Cell* **28**: 1078–1093

- Dathan N, Zaccaro L, Esposito S, Isernia C, Omichinski JG, Riccio A, Pedone C, Blasio B Di, Fattorusso R, Pedone P V, et al** (2002) The *Arabidopsis* SUPERMAN protein is able to specifically bind DNA through its single Cys2-His2 zinc finger motif. *Nucleic Acids Res* **30**: 4945–4951
- Dauelsberg P, Matus JT, Poupin MJ, Leiva-Ampuero A, Godoy F, Vega A, Arce-Johnson P** (2011) Effect of pollination and fertilization on the expression of genes related to floral transition, hormone synthesis and berry development in grapevine. *J Plant Physiol* **168**: 1667–1674
- de Azevedo Souza C, Soo Kim S, Koch S, Kienow L, Schneider K, Mckim SM, Haughn GW, Kombrink E, Douglas CJ** (2009) A novel fatty acyl-CoA synthetase is required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 507–525
- Desvoyes B, de Mendoza A, Ruiz-trillo I, Gutierrez C** (2014) Novel roles of plant RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein in cell proliferation and asymmetric cell division. *J Exp Bot* **65**: 2657–2666
- DeYoung BJ, Bickle KL, Schrage KJ, Muskett P, Patel K, Clark SE** (2006) The CLAVATA1-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for meristem function in *Arabidopsis*. *Plant J* **45**: 1–16
- Dietz K, Vogel MO, Viehhauser A** (2010) AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma* **245**: 3–14
- Dijk ADJ Van, Molenaar J** (2017) Floral pathway integrator gene expression mediates gradual transmission of environmental and endogenous cues to flowering time. *PeerJ* **5**: 1–18
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR** (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**: 15–21
- Dobritsa AA, Shrestha J, Morant M, Pinot F, Matsuno M, Swanson R, Møller BL, Preuss D** (2009) CYP704B1 is a long-chain fatty acid ω -Hydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **151**: 574–589
- Dokoozlian N** (2000) Grape berry growth and development. *Raisin Prod. Man.* Universidad de California, pp 30–37
- Doughty J, Dixon S, Hiscock SJ, Willis AC, Parkin IAP, Dickinson HG** (1998) PCP-A1, a defensin-like *Brassica* pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. *Plant Cell* **10**: 1333–1347
- Durbarry A, Vizir I, Twell D** (2005) Male germ line development in *Arabidopsis*. *duo pollen* mutants reveal gametophytic regulators of generative cell cycle progression. *Plant Physiol* **137**: 297–307
- Englbrecht CC, Schoof H, Böhm S** (2004) Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics* **5**: 1–17

- Feng J, Meyer CA, Wang Q, Liu JS, Liu XS, Zhang Y** (2012) GFOLD : a generalized fold change for ranking differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics* **28**: 2782–2788
- Ferguson C, Teeri TT, Siika-aho M, Read SM, Bacic A** (1998) Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **206**: 452–460
- Fox J** (2005) The R Commander: A basic-statistics graphical user interface to R. *J Stat Softw* **14**: 1–42
- Gainza-Cortés F** (2011) Caracterización funcional de genes involucrados en el transporte de zonc en vides y su relación con el desarrollo de frutos en *Vitis vinifera* cv. Carménère. Tesis doctoral. Universidad de Talca
- Gainza-Cortés F, Pérez-Díaz R, Pérez-Castro R, Tapia J, Casaretto J, González S, Peña-Cortés H, Ruiz-Lara S, González E** (2012) Characterization of a putative grapevine Zn transporter, VvZIP3, suggests its involvement in early reproductive development in *Vitis vinifera* L. *BMC Plant Biol* **12**: 1–13
- Glöckle B, Urban WJ, Nagahara S, Andersen ED, Higashiyama T, Grini PE, Schnittger A** (2018) Pollen differentiation as well as pollen tube guidance and discharge are independent of the presence of gametes. *Development* **145**: 1–8
- Gökbayrak Z, Engin H** (2019) Determination of floral development Stages In ‘Cabernet Sauvignon’ (*Vitis Vinifera* L. cv.): Highlighting the manifestation of stamens and pistil primordia with new intermediate stages linking the phenological stages. *Ciência Téc Vitiv* **34**: 84–90
- Göktürk N, Harmankaya N** (2005) Changes in endogenous hormone levels during the ripening of grape cultivars having different berry set mechanisms. *Turkish J Agric For* **29**: 205–210
- Gómez JF, Talle B, Wilson ZA** (2015) Anther and pollen development: A conserved developmental pathway. *J Integr Plant Biol* **57**: 876–891
- González S** (2013) Caracterización estructural y funcional de genes que codifican para proteínas asociadas a la red regulatoria del desarrollo floral y frutal en *Vitis vinifera* cv. Caménère. Tesis doctoral. Universidad de Talca
- Gray-Mitsumune M, O’Brien M, Bertrand C, Tebbji F, Nantel A, Matton D** (2006) Loss of ovule identity induced by overexpression of the fertilization-related kinase 2 (*ScFRK2*), a MAPKKK from *Solanum chacoense*. *J Exp Bot* **57**: 4171–4187
- Grimplet J, Bert P, Bitz O, Cantu D, Davies C, Delrot S, Pezzotti M, Rombauts S, Cramer GR** (2014) The grapevine gene nomenclature system. *BMC Genomics* **15**: 1–14
- Grimplet J, Martínez-Zapater JM, Carmona MJ** (2016) Structural and functional annotation of the MADS-box transcription factor family in grapevine. *BMC Genomics* **17**: 1–23

- Gusti A, Baumberger N, Nowack M, Pusch S, Eisler H, Potuschak T, De Veylder L, Schnittger A, Genschik P** (2009) The *Arabidopsis thaliana* F-box protein FBL17 is essential for progression through the second mitosis during pollen development. *PLoS One* **4**: 1–10
- Hafidh S, Fila J, Honys D** (2016) Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant Reprod* **29**: 31–51
- Hamès C, Ptchelkine D, Grimm C, Thevenon E, Moyroud E, Benlloch F, Martiel J-L, Reyes B, Parcy F, Müller C** (2008) Structural basis for LEAFY floral switch function and similarity with helix-turn-helix proteins. *EMBO J* **27**: 2628–2637
- Han Y, Zhang A, Huang L, Yu X, Yang K, Fan S, Cao J** (2011) BcMF20, a putative pollen-specific transcription factor from *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Mol Biol Rep* **38**: 5321–5325
- Han YY, Zhou HY, Xu LA, Liu XY, Fan SX, Cao JS** (2018) The zinc-finger transcription factor BcMF20 and its orthologs in Cruciferae which are required for pollen development. *Biochem Biophys Res Commun* **503**: 998–1003
- Hartmann U, Höhmann S, Nettekheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P** (2000) Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J* **21**: 351–360
- Hellens RP, Allan AC, Friel EN, Bolitho K, Grafton K, Templeton MD, Karunairetnam S, Gleave AP, Laing WA** (2005) Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods* **1**: 1–14
- Higashiyama T, Takeuchi H** (2015) The mechanism and key molecules involved in pollen tube guidance. *Annu Rev Plant Biol* **66**: 393–413
- Higashiyama T, Yang W** (2017) Gametophytic pollen tube guidance: Attractant peptides, gametic controls, and receptors. *Plant Physiol* **173**: 112–121
- Hiscock SJ, Doughty J, Willis AC, Dickinson HG** (1995) A 7-kDa pollen coating-borne peptide from *Brassica napus* interacts with S-locus glycoprotein and S-locus-related glycoprotein. *Planta* **196**: 367–374
- Honys D, Reňák D, Twell D** (2006) Male gametophyte development and function. *Floriculture Ornamental Plant Biotechnology*, 1st ed. Global Science Books, Ltd, Isleworth, pp 76–87
- Honys D, Twell D** (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol* **5**: R85
- Hord CLH, Chen C, DeYoung BJ, Clark SE, Ma H** (2006) The BAM1/BAM2 receptor-like kinases are important regulators of *Arabidopsis* early anther development. *Plant Cell* **18**: 1667–1680
- Hord CLH, Sun Y-J, Pillitteri LJ, Torii KU, Wang H, Zhang S, Ma H** (2008) Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Mol Plant* **1**: 645–658

- Huang J, Zhao X, Cheng K, Jiang Y, Ouyang Y, Xu C, Li X, Xiao J, Zhang Q** (2013) OsAP65, a rice aspartic protease, is essential for male fertility and plays a role in pollen germination and pollen tube growth. *J Exp Bot* **64**: 3351–3360
- Hundertmark M, Hinch DK** (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **9**: 1–22
- Immink RGH, Posé D, Ferrario S, Ott F, Kaufmann K, Valentim FL, de Folter S, van der Wal F, van Dijk ADJ, Schmid M, et al** (2012) Characterization of SOC1's central role in flowering by the identification of its upstream and downstream regulators. *Plant Physiol* **160**: 433–449
- Impe D, Reitz J, Köpnick C, Rolletschek H, Börner A, Senula A, Nagel M** (2020) Assessment of pollen viability for wheat. *Front Plant Sci* **10**: 1–13
- Ito T, Wellmer F, Yu H, Das P, Ito N, Alves-Ferreira M, Riechmann JL, Meyerowitz EM** (2004) The homeotic protein AGAMOUS controls microsporogenesis by regulation of *SPOROCTELESS*. *Nature* **430**: 356–360
- Iwakawa H, Shinmyo A, Sekine M** (2006) *Arabidopsis* CDKA;1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. *Plant J* **45**: 819–831
- Jaillon O, Aury J-M, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, et al** (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**: 463–7
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901–3907
- Jenkins TH, Li J, Scutt CP, Gilmartin PM** (2005) Analysis of members of the *Silene latifolia* Cys2/His2 zinc-finger transcription factor family during dioecious flower development and in a novel stamen-defective mutant *ssf1*. *Planta* **220**: 559–571
- Johnson MA, Harper JF, Palanivelu R** (2019) A fruitful journey: Pollen tube navigation from germination to fertilization. *Annu Rev Plant Biol* **70**: 809–837
- Kapoor S, Kobayashi A, Takatsuji H** (2002) Silencing of the tapetum-specific Zinc Finger Gene *TAZI* Causes Premature Degeneration of Tapetum and Pollen Abortion in Petunia. **14**: 2353–2367
- Kapoor S, Takatsuji H** (2006) Silencing of an anther-specific zinc-finger gene, *MEZ1*, causes aberrant meiosis and pollen abortion in petunia. *Plant Mol Biol* **61**: 415–430
- Karcher SJ** (2002) Blue plants: Transgenic plants with the Gus reporter gene. Test. Stud. Lab. Teach. Association for Biology Laboratory Education (ABLE), West Lafayette, pp 29–42
- Kasahara RD, Portereiko MF, Sandaklie-Nikolova L, Rabiger DS, Drews GN** (2005) *MYB98* is required for pollen tube guidance and synergid cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 2981–2992

- Kasajima I, Ide Y, Ohkama-Ohtsu N, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T** (2004) A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Mol Biol Report* **22**: 49–52
- Kaufmann K, Wellmer F, Muiño JM, Ferrier T, Wuest SE, Kumar V, Serrano-Mislata A, Madueño F, Krajewski P, Meyerowitz EM, et al** (2010) Orchestration of floral initiation by *APETALA1*. *Science* (80-) **328**: 85–90
- Keller C, Baggiolini M** (1954) Les Stades reperes dans la Vegetation du ble. *Rev Rom d'Agriculture, Lausanne* **10**: 17–20
- Keller M** (2015) *The science of grapevines: anatomy and physiology*, second edi. Elsevier, Washington, USA
- Kim HJ, Oh SA, Brownfield L, Hong SH, Ryu H, Hwang I, Twell D, Nam HG** (2008a) Control of plant germline proliferation by SCF FBL17 degradation of cell cycle inhibitors. *Nature* **455**: 1134–1137
- Kim SY, Yu X, Michaels SD** (2008b) Regulation of *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUS T* expression in response to changing light quality. *Plant Physiol* **148**: 269–279
- Kobayashi A, Sakamoto A, Kubo K, Rybka Z, Kanno Y, Takatsuji H** (1998) Seven zinc-finger transcription factors are expressed sequentially during the development of anthers in petunia. *Plant J* **13**: 571–6
- Kondou Y, Nakazawa M, Kawashima M, Ichikawa T, Yoshizumi T, Suzuki K, Ishikawa A, Koshi T, Matsui R, Muto S, et al** (2008) RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth. *Plant Physiol* **147**: 1924–1935
- Kubo K, Kanno Y, Nishino T, Takatsuji H** (2000) Zinc-Finger genes that specifically express in pistil secretory tissues of petunia. *Plant Cell Physiol* **41**: 377–382
- Kubo K, Sakamoto A, Kobayashi A, Rybka Z, Kanno Y, Nakagawa H, Nishino T, Takatsuji H** (1998) Cys 2/His2 zinc-finger protein family of petunia: evolution and general mechanism of target-sequence recognition. *Nucleic Acids Res* **26**: 608–615
- Kubo K, Takatsuji H** (2007) Transgene-dependent incompatibility induced by introduction of the *SK2:ZPT2-10* chimeric gene in petunia. *Transgenic Res* **16**: 85–97
- Kühn N, Arce-Johnson P** (2012) Pollination: A key event controlling the expression of genes related to phytohormone biosynthesis during grapevine berry formation. *Plant Signal Behav* **7**: 7–11
- Leal Valentim F, van Mourik S, Posé D, Kim MC, Schmid M, van Ham RCHJ, Busscher M, Sanchez-Perez GF, Molenaar J, Angenent GC, et al** (2015) A quantitative and dynamic Model of the *Arabidopsis* flowering time gene regulatory network. *PLoS One* **10**: 1–18
- Lebon G, Duchêne E, Brun O, Clément C** (2005) Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Ann Bot* **95**: 943–948

- Lebon G, Duchêne E, Brun O, Magné C, Clément C** (2004) Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sex Plant Reprod* **17**: 71–79
- Lebon G, Wojnarowicz G, Holzappel B, Fontaine F, Vaillant-Gaveau N, Clement C** (2008) Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J Exp Bot* **59**: 2565–2578
- Lenhard M, Bohnert A, Jürgens G, Laux T** (2001) Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* **105**: 805–814
- Lewis MW, Leslie M, Fulcher E, Darnielle L, Healy P, Youn J-Y, Lijegren S** (2010) The SERK1 receptor-like kinase regulates organ separation in *Arabidopsis* flowers. *Plant J* **62**: 1–19
- Li D, Liu C, Shen L, Wu Y, Chen H, Robertson M, Helliwell CA, Ito T, Meyerowitz E, Yu H** (2008) Article a repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **15**: 110–120
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Subgroup 1000 Genome Project Data Processing** (2009) The sequence alignment /map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078–2079
- Li P, Ben-Menni Shuler S, Reeder SH, Wang R, Suarez Santiago VN, Dobritsa AA** (2018) INP1 involvement in pollen aperture formation is evolutionarily conserved and may require species-specific partners. *J Exp Bot* **69**: 983–996
- Li WT, He M, Wang J, Wang Y-P** (2013) Zinc finger protein (ZFP) in plants-A review. *Plant Omics* **6**: 474–480
- Liang J, Guan P, Liu Z, Wang Y, Xing J, Hu J** (2020) The *VvSUPERMAN-like* gene is differentially expressed between bicarpellate and tricarpellate florets of *Vitis vinifera* L. cv. ‘Xiangfei’ and its heterologous expression reduces carpel number in tomato. *Plant Cell Physiol Epub ahead*: 1–45
- Liang Y, Tan Z, Zhu L, Niu Q, Zhou J, Li M, Chen L, Zhang X, Ye D** (2013) MYB97, MYB101 and MYB120 function as male factors that control pollen tube-synergid interaction in *Arabidopsis thaliana* fertilization. *PLoS Genet* **9**: 1–16
- Lin H, Yu J, Pearce SP, Zhang D, Wilson ZA** (2017) RiceAntherNet: a gene co-expression network for identifying anther and pollen development genes. *Plant J* **92**: 1076–1091
- Liu L, Fan X** (2013) Tapetum: regulation and role in sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **83**: 165–75
- 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
- Lora J, Herrero M, Hormaza JI** (2009) The coexistence of bicellular and tricellular pollen in *Annona cherimola* (Annonaceae): Implications for pollen evolution. *Am J Bot* **96**: 802–808

- Lou Y, Zhou H-S, Han Y, Zeng Q-Y, Zhu J, Yang Z-N** (2018) Positive regulation of *AMS* by TDF1 and the formation of a TDF1–AMS complex are required for anther development in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **217**: 378–391
- Love MI, Huber W, Anders S** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 1–21
- Lyu T, Cao J** (2018) Cys2/His2 zinc-finger proteins in transcriptional regulation of flower development. *Int J Mol Sci* **19**: 1–15
- Lyu T, Hu Z, Liu W, Cao J** (2019) *Arabidopsis* Cys2/His2 zinc-finger protein MAZ1 is essential for intine formation and exine pattern. *Biochem Biophys Res Commun* **518**: 299–305
- Lyu T, Liu W, Hu Z, Xiang X, Liu T, Xiong X, Cao J** (2020) Molecular characterization and expression analysis reveal the roles of Cys2/His2 zinc-finger transcription factors during flower development of *Brassica rapa* subsp. *chinensis*. *Plant Mol Biol* **102**: 123–141
- Michaels SD, Amasino RM** (1999) *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS Domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**: 949–956
- Millar AA, Gubler F** (2005) The *Arabidopsis* GAMYB-like genes, *MYB33* and *MYB65*, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* **17**: 705–721
- Minio A, Lin J, Gaut BS, Cantu D** (2017) How single molecule real-time sequencing and haplotype phasing have enabled reference-grade diploid genome assembly of wine grapes. *Front Plant Sci* **8**: 1–6
- Muñoz-Rodríguez AF, Tormo R, Silva MI** (2011) Pollination dynamics in *Vitis vinifera* L. *Am J Enol Vitic* **62**: 113–117
- Nakaune S, Yamada K, Kondo M, Kato T, Tabata S, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2005) A vacuolar processing enzyme, δ VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. *Plant Cell* **17**: 876–887
- Nibau C, Di Stilio VS, Wu H-M, Cheung AY** (2011) *Arabidopsis* and tobacco *SUPERMAN* regulate hormone signalling and mediate cell proliferation and differentiation. *J Exp Bot* **62**: 949–961
- Noir S, Marrocco K, Masoud K, Thomann A, Gusti A, Bitrian M, Schnittger A, Genschik P** (2015) The control of *Arabidopsis thaliana* growth by cell proliferation and endoreplication requires the F-box protein FBL17. *Plant Cell* **27**: 1461–1476
- O'Brien M, Gray-Mitsumune M, Kapfer C, Bertrands C, Matton D** (2007) The ScFRK2 MAP kinase kinase kinase from *Solanum chacoense* affects pollen development and viability. *Planta* **225**: 1221–1231
- Ó'Maoiléidigh DS, Graciet E, Wellmer F** (2014) Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytol* **201**: 16–30

- Okamuro JK, Caster B, Villarroel R, Van Montagu M, Jofoku D** (1997) The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 7076–7081
- Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, Sprunck S, Takeuchi H, Yui R, Kasahara RD, Hamamura Y, Mizukami A, Susaki D, et al** (2009) Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* **458**: 357–361
- Pagnussat GC, Yu H, Ngo QA, Rajani S, Mayalagu S, Johnson CS, Capron A, Pagnussat GC, Yu H, Ngo QA, et al** (2005) Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* **132**: 603–614
- Palumbo F, Vannozzi A, Magon G, Lucchin M, Barcaccia G** (2019) Genomics of flower identity in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Front Plant Sci* **10**: 1–15
- Park SK, Howden R, Twell D** (1998) The *Arabidopsis thaliana* gametophytic mutation gemini pollen1 disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development* **125**: 3789–3799
- Pereira HS, Delgado M, Avó AP, Barão A, Serrano I, Viegas W** (2014) Pollen grain development is highly sensitive to temperature stress in *Vitis vinifera*. *Aust J Grape Wine Res* **20**: 474–484
- Pérez R** (2011) Caracterización funcional de genes que codifican para transportadores de boro expresados diferencialmente durante el desarrollo reproductivo de *Vitis vinifera* L. cv. Carménère. Tesis doctoral. Universidad de Talca
- Peterson R, Slovin JP, Chen C** (2010) A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *Int J Plant Biol* **1**: 66–69
- Phan HA, Iacuone S, Li SF, Parish RW** (2011) The MYB80 transcription factor is required for pollen development and the regulation of tapetal programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 2209–2224
- Porter R, Durrel M, H R** (1946) The use of 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride as a measure of seed germinability. *Plant Physiol* 149–159
- Prunet N, Yang W, Das P, Meyerowitz EM, Jack TP** (2017) *SUPERMAN* prevents class B gene expression and promotes stem cell termination in the fourth whorl of *Arabidopsis thaliana* flowers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 7166–7171
- Punwani JA, Rabiger DS, Lloyd A, Drews GN** (2008) The *MYB98* subcircuit of the synergid gene regulatory network includes genes directly and indirectly regulated by MYB98. *Plant J* **55**: 406–414
- Raynal M, Guilleminot J, Gueguen C, Cooke R, Delseny M, Gruber V** (1999) Structure, organization and expression of two closely related novel Lea (late-embryogenesis-abundant) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **40**: 153–165

- 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**: 1–11
- Rejón JD, Delalande F, Schaeffer-Reiss C, Alché J de D, Rodríguez-García MI, Van Dorselaer A, Castro AJ** (2016) The pollen coat proteome: At the cutting edge of plant reproduction. *Proteomes* **4**: 1–23
- Ristic R, Iland PG** (2005) Relationships between seed and berry development of *Vitis Vinifera* L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Aust J Grape Wine Res* **11**: 43–58
- Ruelens P, Zhang Z, van Mourik H, Maere S, Kaufmann K, Geuten K** (2017) The origin of floral organ identity quartets. *Plant Cell* **29**: 229–242
- Sabelli PA, Larkins BA** (2009) Regulation and function of retinoblastoma-related plant genes. *Plant Sci* **177**: 540–548
- Sakai H, Medrano LJ, Meyerowitz E** (1995) Roles of *SUPERMAN* in maintaining *Arabidopsis* floral whorl boundaries. *Nature* **378**: 199–203
- Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, McIntire KN, Hsu Y-C, Lee PY, Truong MT, Beals TP, Goldberg RB** (1999) Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sex Plant Reprod* **11**: 297–322
- Schiefthaler U, Balasubramanian S, Sieber P, Chevalier D, Wisman E, Schneitz K** (1999) Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 11664–11669
- Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG** (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell* **16**: S46–S60
- Selinski J, Scheibe R** (2014) Pollen tube growth: where does the energy come from? *Plant Signal Behav* **9**: 1–9
- Servicio Agrícola y Ganadero** (2017) Catastro vitícola nacional. Disponible en <http://www.sag.cl/content/catastro-viticola-nacional-2017>
- Seymour GB, Østergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C** (2013) Fruit development and ripening. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 219–241
- Shi D-Q, Yang W-C** (2010) Pollen germination and tube growth. *Plant Dev. Biol. - Biotechnol. Perspect.* Springer, Berlin, pp 245–282
- Shi J, Cui M, Yang L, Kim YJ, Zhang D** (2015) Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development. *Trends Plant Sci* **20**: 741–753
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM** (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 755–767

- Sofroni K, Takatsuka H, Yang C, Dissmeyer N, Komayi S, Hamamura Y, Böttger L, Umeda M, Schnittger A** (2020) CDKD-dependent activation of CDKA;1 controls microtubule dynamics and cytokinesis during meiosis. *J Cell Biol* **219**: 1–21
- Sorensen AM, Kröber S, Unte US, Huijser P, Dekker K, Saedler H** (2003) The *Arabidopsis* *ABORTED MICROSPORES (AMS)* gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J* **33**: 413–423
- Spence J, Vercher Y, Gates P, Harris N** (1996) “Pod shatter” in *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *B. juncea*. *J Microsc* **181**: 195–203
- Steinhorst L, Kudla J** (2012) Calcium - a central regulator of pollen germination and tube growth. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 1573–1578
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T** (2011) Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* **6**: e21800
- Takatsuji H** (1998) Zinc-finger transcription factors in plants. *C Cell Mol Life Sci* **54**: 582–596
- Takatsuji H, Nakamura N, Katsumoto Y** (1994) A new family of zinc finger proteins in petunia: structure, DNA sequence recognition, and floral organ-specific expression. *Plant Cell* **6**: 947–958
- Takayama S, Shiba H, Iwano M, Asano K, Hara M, Che F, Watanabe M, Hinata K, Isogai A** (2000) Isolation and characterization of pollen coat proteins of *Brassica campestris* that interact with S locus-related glycoprotein 1 involved in pollen – stigma adhesion. *PNAS* **97**: 3765–3770
- Takeuchi H, Higashiyama T** (2016) Tip-localized receptors control pollen tube growth and LURE sensing in *Arabidopsis*. *Nature* **531**: 245–248
- Theißen G** (2001) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 75–85
- Theißen G, Gramzow L** (2016) Structure and evolution of plant MADS domain transcription factors. *Plant Transcr. Factors*. Elsevier Inc., London, pp 127–138
- Theißen G, Melzer R** (2007) Combinatorial control of floral organ identity by MADS-domain transcription factors. *Regul. Transcr. plants*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp 253–265
- Theißen G, Melzer R, Rümpler F** (2016) MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution. *Development* **143**: 3259–3271
- Theißen G, Saedler H** (2001) Floral quartets. *Nature* **409**: 469–471
- This P, Lacombe T, Thomas MR** (2006) Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet* **22**: 511–519

- Thomson B, Wellmer F** (2019) Molecular regulation of flower development. *Plant Dev. Evol.*, 1st ed. Elsevier Inc., Cambridge, pp 185–210
- Tian T, Liu Y, Yan H, You Q, Yi X, Du Z, Xu W, Su Z** (2017) agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res* **45**: 122–129
- Vasconcelos MC, Greven M, Winefield CS, Trought MCT, Raw V** (2009) The flowering process of *Vitis vinifera*: A review. *Am J Enol Vitic* **60**: 411–434
- Velasco R, Zharkikh A, Troglio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, FitzGerald LM, Vezzulli S, Reid J, et al** (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* **2**: 1–18
- Verma N** (2019) Transcriptional regulation of anther development in *Arabidopsis*. *Gene* **689**: 202–209
- Verma P, Kaur H, Petla BP, Rao V, Saxena SC, Majee M** (2013) PROTEIN L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE2 is differentially expressed in chickpea and enhances seed vigor and longevity by reducing abnormal isoaspartyl accumulation predominantly in seed nuclear proteins. *Plant Physiol* **161**: 1141–1157
- Verma P, Majee M** (2013) Seed Germination and Viability Test in Tetrazolium (TZ) Assay. *Bio-Protocol* **53**: 1–4
- Vishwanath S, Domergue F, Rowland O** (2014) Seed coat permeability test: Tetrazolium penetration assay. *Bio-Protocol* **4**: 1–4
- Vivian-Smith A, Luo M, Chaudhury A, Koltunow A** (2001) Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development* **128**: 2321–2331
- Vizcay-Barrena G, Wilson ZA** (2006) Altered tapetal PCD and pollen wall development in the *Arabidopsis* *msl* mutant. *J Exp Bot* **57**: 2709–2717
- Wahl V, Ponnu J, Schlereth A, Arrivault S, Langenecker T, Franke A, Feil R, Lunn JE, Stitt M, Schmid M** (2013) Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* (80-) **339**: 704–707
- Wang K, Ding Y, Cai C, Chen Z, Zhu C** (2019) The role of C2H2 zinc finger proteins in plant responses to abiotic stresses. *Physiol Plant* **165**: 690–700
- Wang K, Guo ZL, Zhou WT, Zhang C, Zhang ZY, Lou Y, Xiong SX, Yao XZ, Fan JJ, Zhu J, et al** (2018) The regulation of sporopollenin biosynthesis genes for rapid pollen wall formation. *Plant Physiol* **178**: 283–294
- Wang L, Clarke LA, Eason RJ, Parker CC, Qi B, Scott RJ, Doughty J** (2017) PCP-B class pollen coat proteins are key regulators of the hydration checkpoint in *Arabidopsis thaliana* pollen–stigma interactions. *New Phytol* **213**: 764–777
- Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU** (2005) Integration of Spatial and Temporal Information During Floral Induction in *Arabidopsis*. *Science* (80-) **309**: 1056–1059

- Wilson Z, Zhang D-B** (2009) From *Arabidopsis* to rice: pathways in pollen development. *J Exp Bot* **60**: 1479–92
- Wilson ZA, Morroll SM, Dawson J, Swarup R, Tighe PJ** (2001) The *Arabidopsis* *MALE STERILITY1* (*MS1*) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *Plant J* **28**: 27–39
- Wilson ZA, Yang C** (2004) Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development. *Reproduction* **128**: 483–492
- Winter CM, Ryan SA, Blanvillain-Baufumé S, Reback MA, Monniaux M, Wu M, Sang Y, Yamaguchi A, Yamaguchi N, Parker JE, et al** (2011) LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis motifs, and a link to biotic stimulus response. *Dev Cell* **20**: 430–443
- Wollmann H, Mica E, Todesco M, Long JA, Weigel D** (2010) On reconciling the interactions between APETALA2, miR172 and AGAMOUS with the ABC model of flower development. *Development* **137**: 3633–3642
- Wu W, Wu Y, Gao Y, Li M, Yin H, Lv M, Zhao J, Li J, He K** (2015) Somatic embryogenesis receptor-like kinase 5 in the ecotype Landsberg erecta of *Arabidopsis* is a functional RD LRR-RLK in regulating brassinosteroid signaling and cell death control. *Front Plant Sci* **6**: 1–16
- Xie M, Sun J, Gong D, Kong Y** (2019) The roles of *Arabidopsis* C1-2i subclass of C2H2-type Zinc-Finger transcription factors. *Genes* **653**: 1–15
- Xu J, Ding Z, Vizcay-Barrena G, Shi J, Liang W, Yuan Z, Werck-Reichhart D, Schreiber L, Wilson Z a, Zhang D** (2014) *ABORTED MICROSPORES* acts as a master regulator of pollen wall formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 1544–1556
- Yang C, Sofroni K, Wijnker E, Hamamura Y, Carstens L, Harashima H, Stolze SC, Vezon D, Chelysheva L, Orban-nemeth Z, et al** (2020) The *Arabidopsis* Cdk 1/Cdk 2 homolog CDKA;1 controls chromosome axis assembly during plant meiosis. *EMBO J* **39**: 1–19
- Yang C, Vizcay-Barrena G, Conner K, Wilson ZA** (2007) *Male Sterility1* is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. *Plant Cell* **19**: 3530–3548
- Yang S-L, Xie L, Mao H, Puah CS, Yang W, Jiang L, Sundaresan V, Ye D** (2003) *TAPETUM DETERMINANT1* is required for cell specialization in the *Arabidopsis* anther. *Plant Cell* **15**: 2792–2804
- Yang W-C, Ye D, Xu J, Sundaresan V** (1999) The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev* **13**: 2108–2117
- Yoo SJ, Chung KS, Kim J, Lee JH, Hong SM, Yoo SY, Lee JS, Ahn JH** (2005) *CONSTANS* activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 770–778
- Yu Y-H, Li X-Z, Wu Z-J, Chen D-X, Li G-R, Li X-Q, Zhang G-H** (2016) VvZFP11, a Cys2His2-type zinc finger transcription factor, is involved in defense responses in *Vitis*

vinifera. Biol Plant **60**: 292–298

- Zhang D, Yang L** (2014) Specification of tapetum and microsporocyte cells within the anther. Curr Opin Plant Biol **17**: 49–55
- Zhang W, Sun Y, Timofejeva L, Chen C, Grossniklaus U, Ma H** (2006) Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by *DYSFUNCTIONAL TAPETUM1* (*DYT1*) encoding a putative bHLH transcription factor. Development **133**: 3085–3095
- Zhang Z-B, Zhu J, Gao J-F, Wang C, Li H, Li H, Zhang H-Q, Zhang S, Wang D-M, Wang Q-X, et al** (2007) Transcription factor AtMYB103 is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis*. Plant J **52**: 528–538
- Zhao D-Z, Wang G-F, Speal B, Ma H** (2002) The *EXCESS MICROSPOROCTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. Genes Dev **16**: 2021–2031
- Zhao X, Harashima H, Dissmeyer N, Pusch S, Weimer AK, Bramsiepe J, Bouyer D, Rademacher S, Nowack MK, Novak B, et al** (2012) A General G1/S-phase cell-cycle control module in the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. PLoS Genet **8**: 1–14
- Zhou P, Yang F, Yu J, Ao G, Zhao Q** (2010) Several cis-elements including a palindrome involved in pollen-specific activity of *SBgLR* promoter. Plant Cell Rep **29**: 503–511
- Zhu E, You C, Wang S, Cui J, Niu B, Wang Y, Qi J, Ma H, Chang F** (2015) The DYT1-interacting proteins bHLH010, bHLH089 and bHLH091 are redundantly required for *Arabidopsis* anther development and transcriptome. Plant J **83**: 976–990

IX MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Resumen de estadísticas del procesamiento de filtrado de calidad y mapeo de las lecturas obtenidas por RNA-seq. Se utilizó el genoma de referencia de *Arabidopsis thaliana* TAIR10.

Muestra	Lecturas iniciales (millones)	Lecturas post-trimming (millones)	% de lecturas mapeadas a <i>A. thaliana</i>
WT_R1	52,9	51,1	97,65
WT_R2	56,6	54,9	97
WT_R3	46,7	45,2	96,6
<i>Atzat4</i> (+/-)_R1	55,8	54,3	97,3
<i>Atzat4</i> (+/-)_R2	55,9	54,4	96,97
<i>Atzat4</i> (+/-)_R3	59,5	58	97,42
prom35S:: <i>VviPSZ3/Atzat4</i> _R1	54	52,5	97,23
prom35S:: <i>VviPSZ3/Atzat4</i> _R2	61,7	60,2	97,62
prom35S:: <i>VviPSZ3/Atzat4</i> _R3	38,7	37,6	97,24

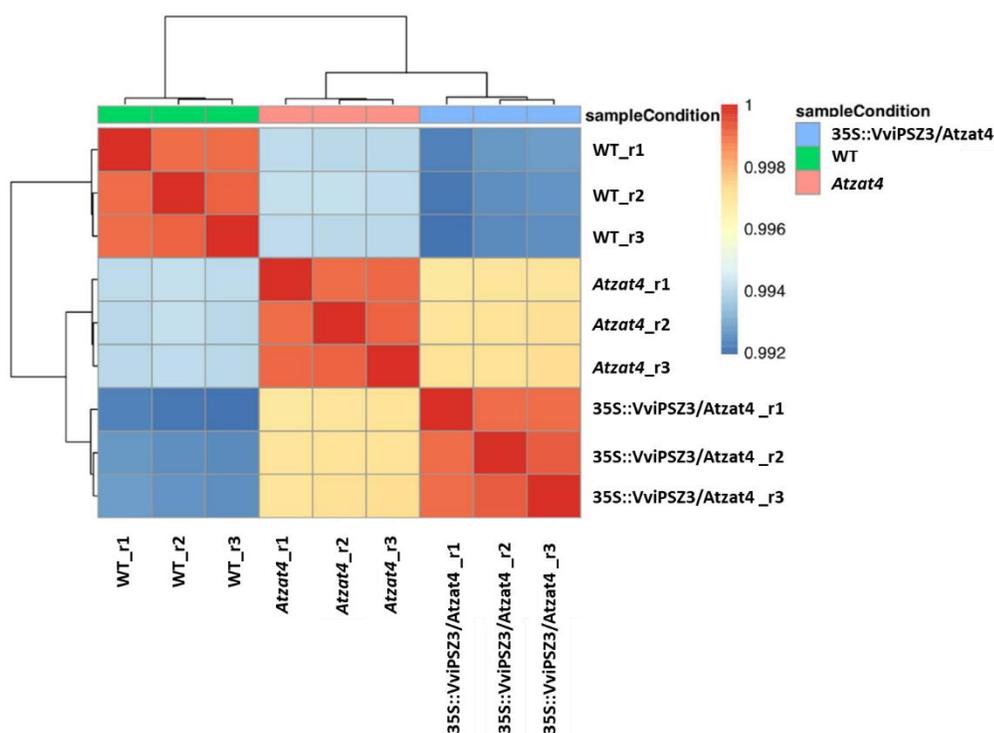


Figura S1. Heat map de agrupación jerárquica (Hierarchical clustering heat map). Correlación jerárquica entre las réplicas de los genotipos estudiados de *Arabidopsis thaliana*. Aumento de la intensidad en la escala de colores indican mayor correlación entre las muestras.

Tabla S2. Genes de *Arabidopsis thaliana* expresados diferencialmente en la comparación WT_35S::VviPSZ3/zat4. Se muestra su log₂ Fold Change (log₂FC) y su *p-value*. Los valores de log₂FC significativos, muestran un un *p-value* < 0,05.

Accesión	log ₂ FC WT_35S::VviPSZ3/zat4	<i>p-value</i>
AT1G01280	0,974459464923342	6,98643843108943e-52
AT1G02580	-1,72832046903675	1,02424339350542e-14
AT1G03010	-1,10306282269146	2,64337298787698e-07
AT1G03080	9,56090049116403	1,77716718620519e-219
AT1G09240	-0,0424194882243191	0,840131223570366
AT1G10745	-3,66787583521414	2,29475485643161e-05
AT1G11925	0,213633822753415	0,793073356118737
AT1G18970	-3,4866159701918	0,000364198304480424
AT1G22090	-1,06288917003428	2,17948262957121e-08
AT1G22130	-1,21483740843171	4,14131140484035e-23
AT1G22770	1,22509820511432	1,43897997121472e-232
AT1G43600	-4,08372678962948	1,24813405102429e-05
AT1G43800	3,91022686948889	4,76170501245226e-37
AT1G47395	-0,575257316781852	0,584524202939598
AT1G48130	-3,1362513553745	0,00455298208643351
AT1G49770	-2,83709419043218	0,0141707450304598
AT1G53480	6,3002266858428	5,90499726674321e-07
AT1G60980	-2,07292704085045	0,0371187129218755
AT1G62940	0,960279039236507	3,98067705768843e-106
AT1G63522	-3,38474469585596	3,29705622866185e-08
AT1G65480	-1,52652045986432	7,48024435842437e-08
AT1G66170	0,888196480377088	0,0109711453619106
AT1G67240	-8,60121463237201	5,85815498174753e-13
AT1G68090	-0,161412977919959	0,611814326553369
AT1G68610	0,450991232916106	0,0195323736164691
AT1G69500	1,02938561243071	1,68990484836246e-80
AT1G71890	-2,39508824720528	2,46772871265987e-155
AT1G79860	-0,424416485772445	0,0197704236312246
AT2G01280	-3,8049208985974	2,77479028916772e-07
AT2G14378	-2,52733655185057	8,31176447175192e-72
AT2G17180	-1,2412155376532	0,0001483794885387
AT2G21740	-2,50191912582562	4,26273601074803e-18
AT2G21750	-2,2697021806988	9,0158563989907e-28
AT2G23148	-2,21825990455631	0,00253727502039696
AT2G26020	-2,31026772381667	1,46131289667061e-05
AT2G28210	2,69647877148853	0,000291360810740741
AT2G37870	1,17160565933087	0,00257408111496468

AT2G40080	1,8183242030613	1,87277080398967e-29
AT2G41260	1,05003030383479	0,108279950137404
AT2G42460	1,49696017279012	0,209674036458457
AT2G45660	0,959558046640724	6,65698240614181e-34
AT2G47040	-1,05098646087382	1,51312411518286e-258
AT3G01345	9,97950709178957	0
AT3G03660	-0,950087924342856	0,332081455341424
AT3G05727	1,64308938591816	0,000218694971114453
AT3G06985	-2,58639327605593	1,55119099634719e-10
AT3G07005	-2,83779577132406	4,1814792298863e-09
AT3G11980	0,838162321411526	8,06393514102033e-99
AT3G12160	-0,776082644532859	1,38760393197264e-05
AT3G13220	0,884166996833621	2,73253710439212e-68
AT3G14210	-2,07940511970193	0
AT3G20210	-2,8059570715755	0
AT3G23240	-1,09777978770191	0,219054373549893
AT3G23380	-0,230144640185514	0,48865369880663
AT3G28470	0,938444114278623	5,51288675734498e-05
AT3G42473	-2,15533315782536	1,26321622804945e-05
AT3G42880	-0,315484885534487	0,0540850602054432
AT3G43505	-3,10129978573752	1,17858733181932e-08
AT3G50310	0,958693035662966	0,000226748543310147
AT3G60570	0,529827840961699	0,0866805706902668
AT3G61120	-1,44895686160837	9,27673608725423e-08
AT4G04500	-0,0403725809914017	0,953299937900997
AT4G09153	-1,93325247036989	1,69717368675828e-05
AT4G09455	-7,22352767782974	1,86773088534263e-09
AT4G12480	-2,1201657535597	0,00692515510362143
AT4G12490	-3,23885605606748	1,50683609327925e-10
AT4G13890	-3,11745329552499	1,04062028692781e-06
AT4G18770	-2,11325778076835	3,65195798446826e-06
AT4G22600	0,799106840412309	0,05435278202328
AT4G24310	-5,30368072177435	2,67916887075275e-05
AT4G24540	1,44541512480679	1,73682349187722e-71
AT4G24975	-2,00256541507408	0,000728480665834034
AT4G26440	-1,27350028237044	8,16115999485709e-20
AT4G30070	-3,29709140952179	0,000225750443885063
AT4G34850	0,92063834225587	4,93588313575676e-78
AT4G37070	-3,74451590532783	6,87789386481528e-06
AT4G39917	-2,49742553378618	6,83841140458632e-08
AT5G02360	-4,79538913945291	3,25858592096613e-05
AT5G06170	-2,07789585884128	1,75755113886637e-05

AT5G07225	-3,87372287259861	2,877314298947e-06
AT5G14380	-1,06981799669754	8,19873108719345e-128
AT5G19360	-0,222239173115878	0,229603755827668
AT5G22260	0,5441006733114	1,05480417990049e-06
AT5G27238	-2,24289832270598	0,0157308803988399
AT5G34883	-4,53425621729629	6,44598590275212e-05
AT5G35660	4,70718488184967	0,000535920033599894
AT5G36240	-2,52736282326555	0,000666427359301067
AT5G36970	-0,563596608566529	0,524100807352954
AT5G37940	3,06982903544561	1,67888922960983e-201
AT5G39820	0,149249305468992	0,802534150758994
AT5G40260	-1,13833279662396	5,41541755455471e-95
AT5G40360	-1,57102476165501	0,096543234702107
AT5G42895	-2,08871718215267	1,18684364282859e-05
AT5G43285	-2,7590735833383	1,78970936227769e-08
AT5G43510	-2,72094189102897	2,9130408376356e-23
AT5G43513	-2,68985133156269	4,77557189123943e-39
AT5G43518	-2,04734331109661	2,56221515695324e-09
AT5G44495	-2,51682538588418	2,2140962325392e-05
AT5G45890	-1,79579302047971	3,12929196071116e-15
AT5G45980	-2,8627748291807	0,000129701157359632
AT5G48605	-2,52075669928952	9,08513236166432e-37
AT5G49180	-1,84764774012772	5,6113020414601e-66
AT5G50260	-1,05869547937929	4,00442036471597e-45
AT5G51105	-1,86357089373673	1,07623639092404e-18
AT5G51870	1,71744972615188	2,04136606808672e-05
AT5G52360	-1,23928357551626	1,07118636745896e-50
AT5G55020	2,04930433320443	0,00124810941408576
AT5G56110	0,870221439418785	2,6147041916055e-06
AT5G58750	1,41013151686282	0,165335525396965
AT5G60945	-1,89142306549923	4,1230913913542e-11
AT5G60964	-1,64174342970028	0,000124346423080512
AT5G61730	-2,43638034188233	3,74362994738699e-38
AT5G61850	0,959429190516668	1,0235626181919e-07
AT5G64720	-2,16491568278993	7,6218828984105e-19

Tabla S3. Genes de *Arabidopsis thaliana* expresados diferencialmente en la comparación WT_*Atzat4* (+/-). Se muestra su log₂ Fold Change (log₂FC) y su *p-value*. Los valores de log₂FC significativos, muestran un un *p-value* < 0,05.

Accesión	log ₂ FC WT_ <i>Atzat4</i> (+/-)	<i>p-value</i>
AT1G01280	-0,128221651196509	0,0294157345427572
AT1G02580	-0,62098288732404	0,00709708793308466
AT1G03010	0,136127253375406	0,54623515190966
AT1G03080	-0,214276380327413	8,79354550991924e-12
AT1G09240	1,52137950800177	4,4186555552187e-11
AT1G10745	-2,38997273649272	0,00682788602220772
AT1G11925	2,83602529485794	0,0054872244868161
AT1G18970	-3,26073104088888	0,000809955078870507
AT1G22090	-1,17388941404775	2,16415504759562e-10
AT1G22130	-1,06103267392075	1,80316762161678e-18
AT1G22770	0,938207696812921	2,86831691885249e-147
AT1G43600	-3,71879096702358	6,77319338605207e-05
AT1G43800	3,84115871707158	2,60299746049707e-45
AT1G47395	-3,51837736686052	8,95508247947009e-05
AT1G48130	-1,51241189033971	0,18765743930756
AT1G49770	0	
AT1G53480	7,72928773862618	8,94829057893996e-10
AT1G60980	-2,60806515556516	0,00681385450813036
AT1G62940	-0,0970512175630464	0,0189005689422177
AT1G63522	-1,49108921314567	0,0201361484071365
AT1G65480	1,06748750413307	0,00139995909894216
AT1G66170	-0,227952010395464	0,46183911438826
AT1G67240	-0,313916485623422	0,841475658175136
AT1G68090	-1,14198127201968	9,32390834789346e-05
AT1G68610	-0,730252176709655	1,84650650202752e-05
AT1G69500	0,0640283216628623	0,197689782346081
AT1G71890	-1,26754511771122	7,48718016450688e-43
AT1G79860	-1,1214361739233	4,38905416232637e-11
AT2G01280	-3,83254628223364	1,84734264637945e-07
AT2G14378	-1,51021583754958	9,377538007236e-26
AT2G17180	-0,971403755818061	0,00272116363577292
AT2G21740	-1,3428154239048	5,9537564414849e-06
AT2G21750	-1,30105943123341	8,86188080049825e-10
AT2G23148	-0,228161651247074	0,775568226933033
AT2G26020	-2,09112655438037	7,69963024387553e-05
AT2G28210	3,16644546184433	2,04862156794083e-05
AT2G37870	2,38389229128629	1,7207079631492e-08

AT2G40080	1,86540045809931	1,76166309069647e-33
AT2G41260	-0,666489374324156	0,218305121579784
AT2G42460	0	
AT2G45660	0,426451634068783	1,40475364647647e-08
AT2G47040	-1,10802243789264	6,27228237570802e-290
AT3G01345	9,98252558902584	0
AT3G03660	0	
AT3G05727	3,11026905860349	1,89631804589226e-09
AT3G06985	-1,6917055051841	3,71932324716924e-05
AT3G07005	-1,6235406013119	0,00104465633678043
AT3G11980	-0,216501228120262	5,07829568718069e-09
AT3G12160	-1,09804109102315	1,54453811168005e-10
AT3G13220	-0,0684482572829394	0,13588963711209
AT3G14210	-2,06970418641691	0
AT3G20210	-1,79182965930993	9,55695029301971e-234
AT3G23240	-2,15060569739182	0,00999054944682028
AT3G23380	-1,17301918256413	0,000133869332734175
AT3G28470	0,181501653196111	0,396177831038397
AT3G42473	-1,2327905415961	0,014353677228941
AT3G42880	-1,10331770892636	3,30089395563086e-13
AT3G43505	-1,97793972653971	0,000358192239079321
AT3G50310	-0,416255291717113	0,0644983941007937
AT3G60570	-0,772970770338476	0,00427611680128067
AT3G61120	-0,97994372536349	0,00030678085957686
AT4G04500	2,50501692153986	0,00466899597120946
AT4G09153	-1,01729493007099	0,0266203712981495
AT4G09455	-6,60434491537341	3,99569956908883e-08
AT4G12480	1,92206201047937	0,0827177583603799
AT4G12490	5,27384382201411	3,59275779915096e-05
AT4G13890	-2,07425263970073	0,00137610306003952
AT4G18770	-0,717586471989253	0,131506585546197
AT4G22600	-0,488785346611299	0,177392254782883
AT4G24310	-4,86716182832176	0,000116042036447965
AT4G24540	0,706412295939985	7,06692226489736e-23
AT4G24975	-2,12750278083653	0,000243496537267531
AT4G26440	-1,24995876801408	8,07351371933863e-20
AT4G30070	-2,20720052781473	0,0152197037942464
AT4G34850	0,0157899437869507	0,734351009200423
AT4G37070	-3,30544829042881	7,14581803549894e-05
AT4G39917	-1,30424557979917	0,00615557322847404
AT5G02360	0,528406449943778	0,727993691504217
AT5G06170	-1,11531342860718	0,0242950862086963

AT5G07225	-3,47583676826834	2,63615639928304e-05
AT5G14380	-1,02843816998075	3,06013622811716e-121
AT5G19360	-1,14082993408227	1,70733233637715e-11
AT5G22260	-0,652328055356617	1,08902685399891e-10
AT5G27238	-0,839791590688313	0,386546292030085
AT5G34883	-2,91157851306966	0,0119316093094793
AT5G35660	-0,958975748090201	0,18181159750807
AT5G36240	-2,87498269466854	7,47317421407984e-05
AT5G36970	0	
AT5G37940	4,33403700236333	5,71814561371271e-292
AT5G39820	4,75820818848211	4,07974236569908e-05
AT5G40260	-1,14010076205086	9,08561679720286e-98
AT5G40360	0	
AT5G42895	-1,38668909497738	0,00396963861024598
AT5G43285	-0,920202461885034	0,0772774719728219
AT5G43510	-0,799205269631703	0,00574090743317656
AT5G43513	-0,694106832919216	0,00169395610914212
AT5G43518	-0,967208924568536	0,00624324933598271
AT5G44495	-1,42576765187305	0,0190011174321855
AT5G45890	0,896528339255567	0,000695054827878969
AT5G45980	-1,75562684190592	0,0217525599512568
AT5G48605	-0,727247993443834	0,000603956036931743
AT5G49180	-1,32954252815004	5,67809945530611e-35
AT5G50260	-0,0192970901794696	0,801984702192299
AT5G51105	-1,09426096173681	3,22554013706581e-07
AT5G51870	0,254460803329783	0,446676525771588
AT5G52360	-1,12717342808411	1,96332761359433e-43
AT5G55020	0,546302465048897	0,284782063536577
AT5G56110	0,236477680782908	0,161643483313208
AT5G58750	-1,2693522290988	0,0932472626198247
AT5G60945	-0,214581006673356	0,481609869995469
AT5G60964	-0,0256146115228721	0,955337581222545
AT5G61730	-1,46116673489923	2,49021903271918e-14
AT5G61850	0,0362374206138235	0,822103033270063
AT5G64720	-1,09196953558859	1,30040690469235e-05

Tabla S4. Genes de *Arabidopsis thaliana* expresados diferencialmente en la comparación *Atzat4* (+/-) *_35S::VviPSZ3/zat4*. Se muestra su log₂ Fold Change (log₂FC) y su *p-value*. Los valores de log₂FC significativos, muestran un un *p-value* < 0,05.

Accesión	log ₂ FC <i>Atzat4</i> (+/-) <i>_35S::VviPSZ3/zat4</i>	<i>p-value</i>
AT1G01280	1,10268111611985	6,13804919497179e-69
AT1G02580	-1,10733758171271	2,08918576488791e-08
AT1G03010	-1,23919007606686	1,68503589379351e-09
AT1G03080	9,77517687149144	1,89311738745109e-229
AT1G09240	-1,56379899622609	1,00928587832708e-11
AT1G10745	-1,27790309872141	0,0195380160804991
AT1G11925	-2,62239147210453	0,0106989698140172
AT1G18970	-0,225884929302912	0,684086210846053
AT1G22090	0,111000244013474	0,502822274974552
AT1G22130	-0,153804734510956	0,152277310465028
AT1G22770	0,286890508301399	5,4737964026769e-14
AT1G43600	-0,364935822605904	0,430558138168299
AT1G43800	0,0690681524173098	0,850520874861291
AT1G47395	2,94312005007867	0,000191980401108596
AT1G48130	-1,62383946503479	0,0508471170465223
AT1G49770	-2,31382621060865	0,018977003692419
AT1G53480	-1,42906105278338	0,405662890110722
AT1G60980	0,535138114714714	0,459355058361095
AT1G62940	1,05733025679955	3,3050139901373e-132
AT1G63522	-1,89365548271028	2,31965870198029e-05
AT1G65480	-2,59400796399739	1,85851912085094e-17
AT1G66170	1,11614849077255	0,000910315553799274
AT1G67240	-8,28729814674858	1,56410938506785e-15
AT1G68090	0,980568294099725	0,000589301312396118
AT1G68610	1,18124340962576	3,99823702179588e-11
AT1G69500	0,965357290767851	2,27643975881659e-73
AT1G71890	-1,12754312949406	1,40208142729017e-51
AT1G79860	0,697019688150859	1,51676920172169e-05
AT2G01280	0,0276253836362357	0,94412031709295
AT2G14378	-1,01712071430098	1,78087464689077e-20
AT2G17180	-0,269811781835141	0,34280987740655
AT2G21740	-1,15910370192082	2,93879880263533e-07
AT2G21750	-0,968642749465387	4,19040832674096e-09
AT2G23148	-1,99009825330924	0,00251591911860723
AT2G26020	-0,2191411694363	0,58448606781903
AT2G28210	-0,469966690355801	0,593365700298882
AT2G37870	-1,21228663195541	0,00690556772042861

AT2G40080	-0,0470762550380168	0,785498830187095
AT2G41260	1,71651967815894	0,00531284710488935
AT2G42460	2,97829057551993	0,00719247557879775
AT2G45660	0,533106412571941	1,40220507005277e-11
AT2G47040	0,0570359770188237	0,0562245691778245
AT3G01345	-0,00301849723626607	0,988871389202095
AT3G03660	-3,06733340623118	0,0101449858008439
AT3G05727	-1,46717967268533	0,0091332354890118
AT3G06985	-0,894687770871824	0,00375204251372516
AT3G07005	-1,21425517001216	0,000849385134557502
AT3G11980	1,05466354953179	1,66351259249559e-162
AT3G12160	0,321958446490287	0,0410933281065034
AT3G13220	0,952615254116561	3,32781686335872e-83
AT3G14210	-0,00970093328502316	0,748762551286633
AT3G20210	-1,01412741226557	1,98838790997891e-129
AT3G23240	1,05282590968991	0,139104397304627
AT3G23380	0,942874542378619	0,00154822686954364
AT3G28470	0,756942461082512	0,000964348145821377
AT3G42473	-0,922542616229263	0,0205887834961852
AT3G42880	0,787832823391873	5,45122203574697e-08
AT3G43505	-1,12336005919781	0,00425270748510933
AT3G50310	1,37494832738008	3,09651220412806e-08
AT3G60570	1,30279861130017	5,48750148561422e-06
AT3G61120	-0,469013136244877	0,0487614645328287
AT4G04500	-2,54538950253127	0,00390223750258797
AT4G09153	-0,915957540298902	0,0152659329406269
AT4G09455	-0,619182762456332	0,0206783163872765
AT4G12480	-4,04222776403906	6,58624081666559e-05
AT4G12490	-8,5126998780816	3,88313302131396e-12
AT4G13890	-1,04320065582427	0,0253368427255778
AT4G18770	-1,39567130877909	0,000433981740934271
AT4G22600	1,28789218702361	0,00107357179048382
AT4G24310	-0,436518893452593	0,386979594959661
AT4G24540	0,739002828866807	1,515154667246e-19
AT4G24975	0,124937365762447	0,775870808892515
AT4G26440	-0,0235415143563611	0,845630403715473
AT4G30070	-1,08989088170707	0,0692393210356609
AT4G34850	0,90484839846892	1,94043407295086e-77
AT4G37070	-0,439067614899011	0,335286430191057
AT4G39917	-1,19317995398701	0,00119866138197173
AT5G02360	-5,32379558939669	3,25560982651646e-06
AT5G06170	-0,9625824302341	0,0147072797280205

AT5G07225	-0,39788610433027	0,373344503827129
AT5G14380	-0,0413798267167941	0,315035107065294
AT5G19360	0,918590760966391	2,08285577210975e-08
AT5G22260	1,19642872866802	9,85327364730586e-30
AT5G27238	-1,40310673201766	0,0718745844926021
AT5G34883	-1,62267770422663	0,00534582597602955
AT5G35660	5,66616062993987	1,88205824246668e-05
AT5G36240	0,347619871402989	0,476767739390475
AT5G36970	-3,80421277602472	0,00367103125731721
AT5G37940	-1,26420796691772	3,01595731970667e-20
AT5G39820	-4,60895888301312	7,25536011561012e-05
AT5G40260	0,00176796542689719	0,972236269092247
AT5G40360	-2,87998766404525	0,00617795001599001
AT5G42895	-0,702028087175292	0,0722211227328704
AT5G43285	-1,83887112145327	2,452994738092e-06
AT5G43510	-1,92173662139727	2,17134491492072e-16
AT5G43513	-1,99574449864347	1,06767923390917e-31
AT5G43518	-1,08013438652807	0,000164428731426758
AT5G44495	-1,09105773401113	0,0177475953138921
AT5G45890	-2,69232135973528	1,78602490609817e-29
AT5G45980	-1,10714798727477	0,0381786390211047
AT5G48605	-1,79350870584568	1,93675530404212e-27
AT5G49180	-0,518105211977677	6,71424817249439e-07
AT5G50260	-1,03939838919982	2,04918941305355e-46
AT5G51105	-0,76930993199992	1,22552097595346e-05
AT5G51870	1,4629889228221	0,000244638083103458
AT5G52360	-0,112110147432154	0,124113353839553
AT5G55020	1,50300186815553	0,0181346948938664
AT5G56110	0,633743758635877	0,000510625370022575
AT5G58750	2,67948374596162	0,00447128265534269
AT5G60945	-1,67684205882587	2,06575852683946e-10
AT5G60964	-1,61612881817741	5,70419634908505e-05
AT5G61730	-0,9752136069831	5,11887183440306e-10
AT5G61850	0,923191769902845	1,53102143914143e-07
AT5G64720	-1,07294614720134	1,38119892090998e-07
