

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	16
A. Importancia y problemáticas en el cultivo de la vid en general y el cultivar carmenere en particular	16
B. El desarrollo de frutos partenocárpicos	16
C. Desarrollo reproductivo	18
D. Las ZFP como reguladores del desarrollo del polen.....	22
HIPÓTESIS.....	24
Objetivo General.....	24
Objetivos específicos.....	24
Capítulo I: Identificación y caracterización masiva de la familia de genes <i>C2H2-ZFP</i> en la vid (familia <i>VviZFP</i>) y selección de genes candidatos.....	25
1.1 INTRODUCCIÓN	26
1.2 METODOLOGÍA.....	29
1.2.1 Identificación de Factores de Transcripción tipo C2H2 zinc-finger en <i>Vitis vinifera</i>	29
1.2.2 Determinación de localización cromosómica y estructura génica	29
1.2.3 Análisis filogenético e identificación de motivos conservados en secuencias aminoacídicas.....	29
1.2.4 Análisis de duplicación génica	30
1.2.5 Cálculo de la relación dN/dS.....	30

1.2.6	Análisis de enriquecimiento de términos de <i>Gene Ontology</i> (GO)	31
1.2.7	Perfiles de expresión génica <i>in silico</i> y agrupación por k-medias de genes <i>VviZFP</i>	31
1.3	RESULTADOS.....	32
1.3.1	Caracterización general y clasificación de la familia <i>VviZFP</i>	35
1.3.2	Las relaciones filogenéticas indican una alta heterogeneidad entre los miembros de la familia <i>VviZFP</i>	37
1.3.3	Los dominios conservados en las <i>VviZFP</i> son consistentes con su papel en la regulación de la expresión génica	38
1.3.4	Evolución de la familia de genes <i>VviZFP</i>	42
1.3.5	El análisis de expresión génica <i>in-silico</i> permite identificar genes <i>VviZFP</i> candidatos a evaluar en el desarrollo de anteras y polen	50
1.4	DISCUSIÓN.....	55
1.4.1	Comprendiendo la evolución y expansión de la familia de genes <i>VviZFP</i>	56
1.4.2	Los dominios y motivos proteicos identificados, además de los C2H2-ZF, podrían ser importantes en la función biológica de las <i>VviZFP</i>	57
CAPÍTULO II: Localización temporal del desarrollo del polen durante el proceso de desarrollo floral en <i>Vitis vinifera</i> cv. 'Carmenere'		59
2.1	INTRODUCCIÓN	60
2.1.1	Generalidades y particularidades de la vid: desarrollo de dos temporadas	60
2.1.2	Desarrollo de polen: Etapas.....	61
2.1.3	Regulación molecular del desarrollo del polen	63
2.1.4	Desarrollo floral en la vid: escalas disponibles	66
2.2	METODOLOGÍA.....	69
2.2.1	Material vegetal y preparación de muestras	69
2.2.2	Estudio de la fenología floral y definición de estado en el sistema E-L	69
2.2.3	Preparados, tinción DAPI y microscopía.....	69
2.2.4	Identificación de genes	70

2.2.5 Alineamiento global de secuencias y análisis filogenético.....	70
2.2.6 Extracción de RNA total y síntesis de ADNc.....	70
2.2.7 Diseño y almacenamiento de partidores para qRT-PCR	70
2.2.8 Análisis de expresión cuantitativa de los genes en estudio (qRT-PCR).....	72
2.2.9 Análisis estadístico.....	72
2.3 RESULTADOS	73
2.3.1 Las muestras colectadas representan el desarrollo floral desde la etapa E-L12 a E-L19.....	73
2.3.2 El desarrollo del polen se observa desde la etapa E-L13 a E-L16.....	73
2.3.3 Los genes evaluados presentan en algunos casos, patrones de expresión coherentes con el desarrollo del polen	76
2.4 DISCUSIÓN.....	82
2.4.1 Predecir eventos claves de la floración utilizando modelos fenológicos.....	84
2.4.2 Regulación del desarrollo reproductivo en la vid.....	84
Capítulo III: Análisis de expresión de genes <i>VviZFPs</i> candidatos.....	88
3.1 INTRODUCCIÓN	89
3.1.1 Regulación transcripcional de C2H2-ZFPs en el desarrollo floral con énfasis en el desarrollo de anteras y polen .	89
3.2 METODOLOGÍA.....	92
3.2.1 Análisis de expresión cuantitativa de los genes en estudio (qRT-PCR)	92
3.2.2 Generación de líneas transgénicas <i>promVviZFP::GUS</i> en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> Domin.....	93
3.2.2.1 Diseño y almacenamiento de partidores	93
3.2.2.2 Amplificación y clonamiento de las regiones promotoras	93
3.2.2.4 Generación de construcciones genéticas para transformación estable.....	94
3.2.2.5 Preparación del material vegetal	94
3.2.2.6 Obtención de plantas transgénicas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	95

3.2.3	Búsqueda de elementos en <i>cis</i> en regiones promotoras de genes <i>VviZFP</i> candidatos.....	95
3.2.4	Ensayos de tinción histoquímica de β -glucuronidasa (GUS).....	96
3.3	RESULTADOS.....	97
3.3.1	Todos los genes <i>VviZFP</i> seleccionados presentan una dinámica de expresión durante el desarrollo floral en la vid	97
3.3.2	Identificación de elementos en <i>cis</i> en la región promotora de <i>VviZFPs</i> candidatos.....	99
3.3.3	Estudio de la expresión tejido específico de genes <i>VviZFP13</i> y <i>VviZFP68</i> en plantas transgénicas de <i>N. benthamiana</i>	101
3.4	DISCUSIÓN.....	104
3.4.1	Regulación transcripcional de C2H2-ZFP en el desarrollo de órganos florales.....	104
3.	DISCUSION GENERAL.....	110
5.	PROYECCIONES.....	113
6.	CONCLUSIONES GENERALES.....	114
7.	SUPLEMENTARIOS.....	115
7.1	Figuras Suplementarias.....	115
7.2	Tablas Suplementarias.....	115
7.1.1	Figura Suplementaria 1.....	116
7.1.2	Figura Suplementaria 2.....	117
6.1.3	Figura Suplementaria 3.....	118
7.1.4	Figura Suplementaria 4.....	119
7.1.5	Figura Suplementaria 5.....	120
7.1.6	Figura Suplementaria 6.....	121
7.2.1	Tabla Suplementaria 1.....	122
8.	ANEXOS.....	124

8.1 Participación en reuniones científicas	124
8.1.1 Eventos Nacionales	124
8.1.2 Eventos Internacionales.....	125
8.2 Artículos científicos publicados	125
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1	Modelos propuestos para el desarrollo floral en arabidopsis 21
Figura 2	Estructura primaria y secundaria de los dominios C2H2-ZF 27
Figura 3	Diagrama del flujo de trabajo utilizado para análisis de duplicación génica 31
Figura 4	Representación gráfica del criterio usado para clasificar los <i>VviZFPs</i> y del nivel de conservación de secuencias entre sus dominios C2H2-ZF 37
Figura 5	<i>VviZFP52</i> como el putativo ortólogo de TFIIIA en la vid 38
Figura 6	Vista analítica del set A de la familia <i>VviZFP</i> 40
Figura 7	Vista analítica del set C de la familia <i>VviZFP</i> 42
Figura 8	Árbol filogenético de las proteínas ELF6 y REF6 de plantas, incluyendo los supuestos ortólogos de la vid 43
Figura 9	Descripción general del represoma-EAR de la familia <i>VviZFP</i> 44
Figura 10	Ideograma de la distribución genómica y duplicaciones en tándem de genes <i>VviZFP</i> en los 19 cromosomas de la vid 46
Figura 11	Eventos de duplicación en tándem en cromosomas de vid 47
Figura 12	Histograma indicando el número de parálogos identificados desde los 98 genes <i>VviZFP</i> analizados 47
Figura 13	Circos-plot de 41 genes <i>VviZFP</i> y sus parálogos a lo largo del genoma de la vid (ensamble versión 12X.V2) 49
Figura 14	Análisis de enriquecimiento de términos de Ontología Génica en la familia <i>VviZFP</i> 50
Figura 15	Atlas de expresión de la familia de genes <i>VviZFP</i> en la vid 53
Figura 16	Expresión diferencial de los genes <i>VviZFP</i> durante el desarrollo floral 55
Figura 17	Diagrama representativo del desarrollo de polen en anteras de plantas con flores 62
Figura 18	Sistema E-L modificado utilizado para etapas del desarrollo de la vid 69
Figura 19	Etapas del desarrollo del microgametofito identificadas en <i>V. vinifera</i> cv. 'Carmenere'. 75
Figura 20	Relaciones filogenéticas entre los genes de estudio y genes ortólogos 79
Figura 21	Expresión de genes homeóticos durante el desarrollo floral en la vid 80
Figura 22	Expresión de genes que putativamente participan del desarrollo del polen, durante el desarrollo floral en la vid 81
Figura 23	Patrones temporales de expresión de los genes EPF en anteras y filamentos 91
Figura 24	Expresión de genes <i>VviZFP</i> candidatos durante el desarrollo floral en la vid 99

Figura 25	Vista esquemática del enriquecimiento con elementos en cis de secuencias promotoras (2000pb) en genes <i>VviZFP</i> candidatos	101
Figura 26	Patrones de expresión génica de <i>VviZFP13</i> y <i>VviZFP68</i> en tejidos florales	103
Figura 27	Relaciones filogenéticas entre <i>VviZFP</i> candidatos y otros C2H2 ZFP de interés	107
Figura 28	Vista esquemática del enriquecimiento con elementos en cis de secuencias promotoras (1600pb) en <i>PhMEZ1</i>	108
Figura 29	Regulación y expresión de genes <i>VviZDP</i>	112
Tabla 1	La familia de genes <i>VviZFP</i> e información relacionada a la secuencia genómica y el producto proteico.	33-36
Tabla 2	Genes <i>VviZFP</i> candidatos seleccionados y su putativo ortólogo en plantas modelo	56
Tabla 3	. Descripción de partidores utilizados en análisis de expresión relativa	72-73
Tabla 4	Resumen de las variables fenotípicas y las etapas del sistema E-L propuestas para el set de muestras del estudio	74
Tabla 5	Fases observadas por microscopía de fluorescencia en las muestras de estudio	77
Tabla 6	Genes evaluados en análisis de expresión génica	78
Tabla 7	Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la determinación de la expresión relativa de los genes en estudio mediante qRT-PCR	93
Tabla 8	Secuencia de oligonucleótidos utilizados para el clonamiento de la región promotora de los genes <i>VviZFP68</i> y <i>VviZFP13</i>	94