

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 |