



Universidad de Talca
Instituto de Ciencias Biológicas

**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO C2H2-ZFP
INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL POLEN DE *Vitis vinifera*”**

OSCAR ANDRES ARREY SALAS

Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, mención Ingeniería Genética Vegetal

Director: Dr. Enrique González Villanueva

Co-Director: Dr. Simón Ruiz Lara

Talca, noviembre 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

"IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DEL TIPO C2H2-ZFP INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL POLEN DE *Vitis vinifera*"

"IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF C2H2-ZFP TRANSCRIPTION FACTORS INVOLVED IN *Vitis vinifera* POLLEN DEVELOPMENT"

OSCAR ANDRES ARREY SALAS

Fecha de inicio: marzo de 2014

Fecha de término: noviembre de 2021

Director de Tesis

Dr. Enrique González Villanueva

Universidad de Talca, Instituto de Ciencias Biológicas

Laboratorio de Genómica Funcional

2 norte 685, casilla 747, Talca

egonzale@utalca.cl

Co-Director de Tesis

Dr. Simón Ruiz Lara

Universidad de Talca, Instituto de Ciencias Biológicas

Laboratorio de Genómica Funcional

2 norte 685, casilla 747, Talca

sruiz@utalca.cl

Dra. Francisca Blanco

Dr. Carlos Figueroa

Dr. Javier Canales

Integrantes de la Comisión de Evaluación de Tesis

Hay un dios, dicen que lo hay
Pero yo, yo no sé cuál es
Como acá está todo al revés
Debe estar cuidando del mal
y el otro normal
debe estar cuidando del bien
Y entonces no sé con cuál quedarme.

Me quedo con
con el sol y los árboles
tu calor y la música
Ya no quiero más explicación
La razón la da el corazón
Y entonces tu amor es mi Dios
y mi religión
Y mi religión es vivir y dejar vivir

Si ya sé
me vas a decir
que hay tipos que no entienden eso
Y también
hay otro peor
que molesta a los que hacen eso
A esos no les des un beso
A esos se le rompe un hueso
Con amor

Hay un dios, dicen que lo hay,
algún día lo entenderé
Si querés, podés argumentar
Pero yo
yo tengo un reloj
Y tengo un reloj natural
muy dentro de mí y ahora ya sé con cuál quedarme

Me quedo con el sol y los árboles...

MI RELIGIÓN – GUSTAVO PENA

DEDICATORIA

A mis padres Teresa y Oscar y a mis hermanas Vivian y Carla, que han sido pilares fundamentales en mi vida.

Les agradezco cada acción, admiro y amo.

A todos esos humanos que de alguna manera han influido en mi vida y han hecho más grato el camino.

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

RESUMEN

En la vid (*Vitis vinifera* L.) se ha sugerido que malformaciones generadas en el desarrollo del polen, reduce el potencial de germinación y la entrega de células espermáticas a los óvulos, aumentando la incidencia del desarrollo de frutos partenocárpicos (DFP), con un impacto negativo en la calidad del vino. Los mecanismos reguladores que controlan la formación de polen siguen siendo desconocidos en la vid. Sin embargo, en otras plantas se ha revelado una red que involucra varios tipos de factores de transcripción través del modelo (A)B(C) del desarrollo floral y se han asignado roles clave a los miembros de la familia de proteínas con dedos de zinc del tipo C2H2 (ZFP). Factores de este tipo han sido asociados a la regulación del desarrollo del polen en petunia, arábidopsis, y otras especies. El silenciamiento de algunos de estos genes provoca alteraciones morfológicas y funcionales en los granos de polen, en las diferentes etapas del desarrollo de estos. La identificación en el genoma de la vid tanto de genes homólogos a aquellos que regulan el desarrollo de anteras y polen en *Arabidopsis thaliana*, así como genes homólogos a la familia *EPF* de petunia, permite sugerir que los mecanismos moleculares similares a los descritos en estas especies modelo, regulan el desarrollo del polen en la vid. Basado en ello se planteó como hipótesis de trabajo:

“La regulación del desarrollo del polen involucra la participación de proteínas factores de transcripción del tipo C2H2-ZFP en *Vitis vinifera* L.”

Para comprender mejor el papel de las ZFP en el desarrollo del polen se realizó una búsqueda de genoma amplio identificando un grupo de 98 genes que codifican para ZFP (familia *VviZFP*), ampliamente distribuidos en el genoma de la vid. Luego de una caracterización general, se seleccionó un grupo de genes *VviZFPs* presumiblemente implicados en el desarrollo del polen, de acuerdo con su perfil de expresión *in silico* y homología con ZFP que regulan el desarrollo del polen, informado en otras plantas modelo. Posteriormente, se posicionaron eventos del desarrollo del polen dentro de la escala del desarrollo floral/frutal en vid (Sistema E-L), con análisis de microscopía y de expresión relativa de genes relacionados en el cultivar ‘Carmenere’. En este cultivar, la especificación de células madre del polen es visible a partir del estadio E-L13 y el desarrollo del polen ocurre entre el estadio E-L13 y E-L16. Luego, se determinó la expresión temporal de un set de genes *VviZFP* candidatos durante un periodo de la segunda temporada del desarrollo floral de la vid, se identificaron elementos de respuesta en las regiones promotoras de estos genes (2000 pb desde el codón de inicio de la transcripción) y finalmente se determinó la actividad órgano específica de la región promotora de *VviZFP11* y *VviZFP67*. Todos los genes *VviZFP* seleccionados mostraron dinámicas de expresión a lo largo del desarrollo floral, lo que sugiere una posible participación de estos en el desarrollo de la vid. Las regiones promotoras presentaron diferentes niveles de enriquecimiento con elementos reguladores *cis* de respuesta a factores de transcripción, de señalización hormonal y elementos de expresión específicos del polen. Se observaron diferencias en la actividad espacio/temporal de los promotores entre *VviZFP68* y el ortólogo propuesto *PhMEZ1*, sugiriendo roles diferentes para ambos genes. Por otro lado, el promotor del gen *VviZFP13* presenta actividad similar a lo observado en *AtDAZ1/2*, además de actividad específica en tejido estigmático, haciéndolo interesante para estudios posteriores. Sin embargo, los perfiles de expresión indican que estos genes están siendo transcritos durante el momento del desarrollo del polen en vid. Finalmente, los resultados generados en esta tesis permiten generar una fuente de información importante que será útil a la hora de desarrollar trabajos posteriores que persigan comprender la participación de un grupo reducido de *VviZFPs* en eventos del desarrollo del polen en la vid.

ABSTRACT

In grapevine (*Vitis vinifera* L.) it has been suggested that malformations generated in the development of pollen, reduces the potential for germination and the delivery of sperm cells to the ovules, increasing the incidence of parthenocarpic fruit development (DFP), with an impact negative on the wine quality. The regulatory mechanisms that control pollen formation remains unknown in grapevine. However, in other plants a network involving various types of transcription factors has been revealed through the (A)B(C) model of flower development and key roles have been assigned to members of the C2H2 type zinc finger protein family (ZFP). Factors of this type have been associated with the regulation of pollen development in petunia, arabidopsis, and other species. The silencing of some of these genes causes morphological and functional alterations in pollen grains, at different stages of their development. The identification in the grapevine genome of genes homologous to those that regulate the development of anthers and pollen in *Arabidopsis thaliana* as well as genes homologous to the EPF family of petunia, allows us to suggest, that molecular mechanisms similar to those described in these model species regulate the pollen development in grapevine. Based on this, it is proposed as a working hypothesis:

"The regulation of pollen development involves the participation of C2H2-ZFP-type transcription factor proteins in *Vitis vinifera* L."

To better understand the role of ZFPs in pollen development, a genome-wide search was carried out identifying a group of 98 genes that code for ZFP (*VviZFP* family), widely distributed in the grapevine genome. After a general characterization, a group of *VviZFP*s genes presumably involved in pollen development was selected according to their *in silico* expression profile and homology with ZFP that regulate pollen development reported in other model plants. Subsequently, pollen development events were positioned within the scale of floral/fruit development in grapevine (E-L System), with microscopy analysis and relative expression of related genes in the 'Carmenere' cultivar. In this cultivar, the pollen stem cell specification is visible from stage E-L13 and pollen development occurs between stage E-L13 and E-L16. Then, the temporal expression of a set of candidate *VviZFP* genes were determined during a period of the second season of floral development in grapevines, response elements were identified in the promoter regions of these genes (2000 bp from the start codon) and finally the specific activity of the promoter region of *VviZFP11* and *VviZFP67* were determined. All the *VviZFP* genes showed these expression dynamics throughout flower development, suggesting a possible participation in grapevine development. The promoter regions present different levels of enrichment with *cis* regulatory elements of response to transcription factors, hormonal signaling, and pollen-specific expression elements. Differences in the spatial/temporal activity of the promoters are observed between *VviZFP68* and the proposed *PhMEZ1* ortholog, suggesting different roles for both genes. On the other hand, the promoter of the *VviZFP13* gene presents activity similar to that observed in *AtDAZ1/2*, in addition to specific activity in stigmatic tissue, making it interesting for subsequent studies. However, the expression profiles indicate that these genes are being transcribed during the time of pollen development in grapevine. Finally, the results generated in this thesis allow generating an important source of information that will be useful when developing subsequent works that seek to understand the participation of a small group of *VviZFP*s in grapevine pollen development events.

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	AGAMOUS
AGL2	AGAMOUS-LIKE2
AMS	ABORTED MICROSPORES
AP	endonucleasa apurínica/apirimidínica
AP1	APETALA1
AP2	APETALA2
AP3	APETALA3
AUX	Auxina
BAM1	BARELY ANY MERISTEM1
BAM2	BARELY ANY MERISTEM1
bHLH	Proteína tipo hélice-bucle-hélice básica
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C2H2-ZFP	Proteínas Cys2/His2-ZF
CAL	CAULIFLORER
CC	Componente Celular
CDKA1	<i>Cyclin-dependent kinase A-1</i>
CDS	Secuencia codificante (<i>Coding Sequence</i>)
CK	Citoquinina o citocinina (<i>Cytokinins</i>)
CLF	CURLY LEAF
CMP	Célula madre del polen
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DAZ1	DUO1-ACTIVATED ZINC FINGER1
DAZ2	DUO1-ACTIVATED ZINC FINGER2
DELLA	Tipo de proteína (por aspartato-glutamato-leucina-leucina-alanina, ó D-E-L-L-A en el código de aminoácidos de 1 letra)
DFP	Desarrollo de frutos partenocárpicos
DOT5	DEFECTIVELY ORGANIZED TRIBUTARIES5
DPA	Días pre-antesis
DUO1	MYB DUO POLLEN1
DYT1	DYSFUNCTIONAL TAPETUM1
E-L	Sistema Eichhorn y Lorenz
ELF6	EARLY FLOWERING6
ET	Etileno
EXOIII	Exonucleasa RNAsa T/ ADN polimerasa III
EXS/EMS1	EXTRA SPOROGENOUS CELLS/EXS MICROSPOROCTES1
FBL17	F BOX-LIKE17
FM	Función Molecular
FOM	Figura de Mérito (<i>Figure of Merit</i>)
FT	Factor de transcripción
FT	FLOWERING LOCUS T

FUL	FRUITFULL
GA	Ácido Giberélico
GCS1/HAP2	GENERATIVE CELL-SPECIFIC1/HAPLESS2
GEX2	GAMETE-EXPRESSED PROTEIN2
GFF3	<i>General Feature Format 3</i>
GO	Ontología Génica (<i>Gene Ontology</i>)
GPM	Grano de polen maduro
GW	Cultivar 'Gewurztraminer'
HMM	Modelo oculto de Márkov (<i>Hidden Markov Model</i>)
HSP	<i>High-scoring segment pair</i>
JAG	JAGGED
JmjC	Jumonji C
JmjN	Jumonji N
KNU	KNUCKLES
KRP6	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor6</i>
KRP7	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor7</i>
LATE	LATE FLOWERING
LFY	LEAFY
LRR-RK	Quinasa del tipo repetición rica en serina treonina leucina (<i>serine threonine leucine rich repeat receptor kinase</i>)
LRR-RLK	Quinasa del tipo repetición rica en leucina (<i>leucine-rich repeat receptor-like</i>)
MA	Meristema apical
MADS	por las proteínas MCM1, AGAMOUS 1, DEFICIENS y SERUM RESPONSE FACTOR
MAZ1	MALE FERTILITY-ASSOCIATED ZINC FINGER PROTEIN1
MCP	Muerte celular programada
MeJA	Metil-jasmonato
MEME	<i>Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation</i>
MEZ1	MEIOSIS-ASSOCIATED ZINC-FINGER PROTEIN1
MF	Meristema floral
MI	Meristema de inflorescencia
MPI	Mitosis del polen I
MPII	Mitosis del polen II
MS1	MALE STERILITY1
NAHR	Eventos de recombinación homóloga no alélica (<i>Non-allelic homologous recombination</i>)
NJ	Método Neighbor joining
NLS	Secuencia de localización nuclear (<i>nuclear localization sequence</i>)
NUB	NUBBIN
ODEPA	Oficina de Estudios y Políticas Agrarias
OIV	Organización Mundial de la Viña y el Vino
PA	Primordio de anteras
PB	Proceso Biológico
PBC	Polen bicelular

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PI	PISTILLATA
PI	Primordio de Inflorescencia
PIN1	PIN-FORMED1
PN	Cultivar 'Pinot Noir'
PTC	Polen tricelular
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RBE	RABBIT EARS
Rcmdr	R Commander
REF6	RELATIVE OF EARLY FLOWERING6
SD	Duplicación segmental (<i>segmental duplication</i>)
SD	Desviación estandar (<i>standard deviation</i>)
SEA	<i>Singular-Enrichment analysis</i>
SEM	Error estandar de la media (<i>standard error of the mean</i>)
SEP1	SEPALLATA1
SEP2	SEPALLATA2
SEP3	SEPALLATA3
SEP4	SEPALLATA4
SERK1	SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1
SERK2	SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE2
SGR5/IDD15	SHOOT GRAVITROPISM5/ ARABIDOPSIS THALIANA INDETERMINATE(ID)-DOMAIN15
SHP1	SHATTERPROOF1
SHP2	SHATTERPROOF2
SOC1	SUPPRESSOR OF CONSTANS1
SPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE
SPL/NZZ	SPOROCTELESS/NOZZLE
STK/AGL11	SEEDSTICK/AGAMOUS-LIKE11
SUF4	SUPPRESSOR OF FRIGIDA4
SUP	SUPERMAN
TAZ1	TAPETUM DEVELOPMENT ZINC FINGER PROTEIN1
TFIIIA	Factor de Transcripción IIIA
TPD1	TAPETAL DETERMINANT1
TPL/TPR	TOPESS/TOPESS RELATED
UTR	Región no traducida (<i>untranslated region</i>)
VFL	el ortólogo de vid de los genes FLORICAULA/LEAFY
VviGADPH	Gen que codifica para la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en vid
VviZFP	Proteína tipo C2H2-ZFP de <i>V. vinifera</i>
YUC1	YUCCA1
YUC4	YUCCA4
ZAT10	ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS10
ZF	Dominio dedo de cinc (<i>zinc-finger domain</i>)

INTRODUCCIÓN GENERAL

A. Importancia y problemáticas en el cultivo de la vid en general y el cultivar carmenere en particular

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una especie ampliamente cultivada y de gran importancia económica ya que sus bayas son aprovechadas mayoritariamente en la producción de vinos y como fruta fresca (uva de mesa) y seca (pasas). Otros productos derivados de uvas o desechos de la vinificación incluyen jugo de uva, etanol, vinagre, aceite de semilla de uva, ácido tartárico, fertilizante entre otros [1]. Sumado a esto, existe un interés creciente en los beneficios para la salud de compuestos antioxidantes derivados de la vid y el vino, como fenilpropanoides, isoprenoides y alcaloides [2]. Algunos de estos se han investigado para el uso en las industrias de aditivos alimentarios, cosméticos y farmacéuticos [1].

El informe estadístico sobre vitivinicultura mundial 2019 de la Organización Mundial de la Viña y el Vino (OIV) (<http://www.oiv.int/>) estima que la superficie mundial plantada con viñedos al año 2018 superó los 7 millones de hectáreas, destinándose el 57% de estos terrenos a la producción de vinos. El mismo informe posiciona a la industria vitivinícola de Chile como la sexta más grande, con una producción de casi 13 millones de hectolitros de vino al año. De acuerdo a las últimas cifras oficiales (ODEPA; Catastro Vitícola Nacional 2017), se destinó una extensión de 136 mil hectáreas al cultivo de la vid en Chile, siendo 'Cabernet Sauvignon', 'Sauvignon Blanc', 'Merlot', 'Chardonnay', 'Pais' y 'Carmenere' los cultivares con mayor superficie plantada. Carmenere es un cultivar de uva tinta de vino, con características organolépticas y agronómicas particulares [3]. Fue cultivado históricamente en las regiones de Graves y Médoc en Burdeos, Francia, hasta antes de que una plaga del hemíptero filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) devastara los viñedos en el siglo XIX llegando a la casi extinción del cultivar en Europa. En Chile fue introducido en la década de 1850 (previo a la crisis filoxérica), manteniéndose erróneamente identificado en los viñedos como Merlot hasta que en 1994 fue redescubierto ampelográficamente y luego validado por *DNA fingerprinting* [4]. Esto despertó un interés mundial por el "cultivar perdido", transformando al cultivar 'Carmenere' en la variedad emblemática de Chile [5]. El cultivar 'Carmenere' se considera vigoroso y de brotación tardía, pero con una tendencia alta a desarrollar trastornos reproductivos como la abscisión de flores y el desarrollo de frutos partenocárpicos (DFP) [6].

B. El desarrollo de frutos partenocárpicos

En la vid se reconocen dos tipos alteraciones que conducen a frutos sin semilla, la estenospermocarpia y la partenocarpia [7]. La fruta obtenida por stenospermocarpia proviene de un evento de polinización/fecundación efectiva, pero el embrión aborta en etapas tempranas generando bayas aparentemente sin semillas. Este es un rasgo apreciado en cultivares para la producción de fruta fresca y seca [8]. En la partenocarpia (o DFP), el desarrollo del ovario continúa en el

fruto aún en ausencia de polinización y/o fecundación produciendo bayas asemilladas estériles [9]. La partenocarpia es un rasgo indeseado en cultivares como 'Carmenere' y en general los utilizados en vitivinicultura ya que afecta negativamente el rendimiento y calidad de la fruta, impactando finalmente en la calidad del vino elaborado. La incidencia de este fenómeno es cultivar y temporada dependiente [6].

En la vid, el DFP se caracteriza por la presencia en un mismo racimo de bayas con semilla de tamaño normal junto con bayas sin semillas de tamaño pequeño (<3 mm) y de tamaño mediano (3-6 mm). Mientras que las bayas pequeñas sin semillas (llamadas *shot berries*) se generan presumiblemente a partir de óvulos defectuosos y no fértiles, las bayas sin semillas de tamaño mediano surgen de un evento de partenocarpia debido a la fertilización defectuosa del óvulo provocado por alteraciones en el crecimiento del tubo polínico y la liberación de células espermáticas en los ovarios [10,11]. Se han relacionado alteraciones en el metabolismo de poliaminas con la incidencia de DFP. La aplicación exógena de poliaminas al final de la floración, como putresina y espermidina disminuyeron significativamente la incidencia de DFP en la vid [12]. También, el DFP suele presentarse frente a factores ambientales desfavorables, por lo que la exposición a temperaturas extremas o lluvias durante floración, suelos pobres y arcillosos, exceso de vigor en los porta injertos utilizados y carencias nutricionales (como deficiencias de Boro, Zinc o Calcio) promueven la incidencia de DFP [6]. El Zinc es necesario como cofactor para más de 300 enzimas y proteínas involucradas en la división celular, el metabolismo de ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas, y es fundamental en el control de la transcripción de genes y la coordinación de otros procesos biológicos regulados por proteínas que contienen dominios Zinc Finger (ZF) (como las C2H2-ZFP, entre otras) [13,14].

Si bien existe investigación orientada a reducir la incidencia de DFP buscando mejorar el rendimiento, poco se conoce respecto a las causas fisiológicas y moleculares que provocan este fenómeno en la vid. La capacidad de germinación del polen es fundamental para la fertilidad y dado que en el DFP no ocurre polinización y/o fertilización efectiva, es razonable pensar que alteraciones en el desarrollo del polen pudiesen conducir al DFP. En algunos cultivares de vid, la presencia de polen normal junto con granos anómalos (número anormal de aberturas o colapsados) conducen a una alta reducción de la productividad [15,16]. En esta línea, Alva y colaboradores [6] (2015) relacionaron la tasa de DFP con la frecuencia de granos de polen aberrante (definidos como granos de polen con anomalías estructurales e incapacidad de germinar), en diferentes cultivares de *Vitis vinifera*. Cultivares como 'Syrah', presentaron un bajo porcentaje de polen defectuoso y una baja incidencia de DFP, mientras que en cultivares como 'Carmenere', se reportó alta tasa de polen estructuralmente aberrante, al mismo tiempo que una alta tasa de DFP. Este reporte sugiere que la fertilización defectuosa del óvulo podría ser causada por un polen morfológicamente anormal que posee una capacidad de germinación reducida o la incapacidad de alargar el tubo polínico, explicando las tasas variables de DFP entre cultivares. El desarrollo floral y específicamente el desarrollo de anteras y polen, tanto a nivel celular como genético molecular, está bien documentado para especies modelo como *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) o *petunia* (*Petunia* × *atkinsiana* (Sweet) D. Don ex W.H. Baxter), pero las

particularidades de estos procesos no están dilucidadas en la vid. En este sentido, la identificación y caracterización de genes candidatos involucrados en el desarrollo del polen, aparece como un interesante enfoque en la búsqueda de causas moleculares que conduzcan a la formación de DFP.

C. Desarrollo reproductivo

El desarrollo reproductivo es una parte importante en el ciclo vital de plantas ya que en esta fase es posible la recombinación del material genético ayudando a la perpetuación de la especie. Particularmente en la vid, la floración para la producción de semillas no es un evento esencial en la industria vitícola ya que la multiplicación de esta especie se realiza mediante esquejes. Sin embargo, considerando que el fruto se origina a partir de la modificación del ovario, se puede indicar que el desarrollo y floral frutal están altamente ligados. Esto hace relevante el estudio del desarrollo floral, ya que alteraciones en estos procesos pueden repercutir negativamente en rasgos como rendimiento y calidad para la industria vitivinícola [17].

El estudio de los mecanismos moleculares que subyacen en la regulación del desarrollo reproductivo en plantas lleva más de tres décadas. La investigación se limitó inicialmente a pocas plantas modelo como *arabidopsis*, *snapdragon* (*Antirrhinum majus* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.), pero hace más de diez años que se reportan estudios del desarrollo en nuevas especies modelo [18]. Los resultados de análisis genéticos y transcriptómicos han permitido la identificación de cientos de genes con funciones reguladoras conocidas o probables en varios aspectos del desarrollo reproductivo. Gran parte de estos genes codifican para factores de transcripción (FT) y corre reguladores de la transcripción [19], microARNs (miRNAs) [20] y proteínas que participan en la regulación de la cromatina [21].

En *arabidopsis*, los genes clave que integran las múltiples señales de floración como *SUPPRESSOR OF CONSTANS1* (*SOCT1*) y *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) inducen la floración en el meristema apical (MA) [22]. La formación de flores ocurre en meristemas florales (MF), los que a su vez se desarrollan en una posición específica del meristema de inflorescencia (MI). El sitio donde se inicia el MF está determinado por un aumento previo de la concentración de auxina a través del transporte polar de la hormona entre células [23]. En *arabidopsis* el aumento local de auxina depende de la actividad de la proteína PIN-FORMED1 (*PIN1*), que se localiza polarmente en las membranas para promover el flujo de auxina. El aumento local de la fitohormona gatilla la respuesta de factores de transcripción y remodeladores de cromatina que terminan por promover la expresión de *LEAFY* (*LFY*), un gen regulador maestro que codifica para un FT y que promueve la identidad temprana de MF. *LFY* tiene una multitud de funciones conocidas durante las etapas tempranas del desarrollo floral. Entre estas, reduce los niveles de ácido giberélico (GA) en el MF provocando la acumulación de proteínas DELLA (sensibles a GA), las que junto al factor de transcripción SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (*SPL*) regulan positivamente la expresión de *APETALA1* (*AP1*), el otro gen clave en la identidad del MF [24]. *AP1* codifica para un factor de transcripción del tipo MADS y

junto al gen parálogo y parcialmente redundante *CAULIFLORER (CAL)* [25] promueven la expresión de *LFY* como parte de un *loop de feedback* positivo que permite la activación específica de los genes de identidad del MF. En conjunto, *AP1/CAL* y *LFY* promueven la identidad de meristemas, suprimen parcialmente la programación genética del desarrollo de brotes propio del meristema y controlan la expresión de genes necesarios para la especificación de los primordios de órganos florales.

Los genes de identidad de órganos florales se expresan en una disposición en espiral y actúan de manera coordinada para controlar la especificación de órganos florales siguiendo el modelo ABC [26–28], actualizado a modelo (A)B(C) para adaptarse a los hallazgos experimentales y progreso conceptual de más de 30 años de investigación [18]. En el modelo ABC original los genes *AP1* y *APETALA2 (AP2)* de función A, controlan la formación de sépalos. Estos junto a los genes de función B *APETALA3 (AP3)* y *PISTILLATA (PI)* regulan la formación de pétalos. La acción de los genes de función B en conjunto con *AGAMOUS (AG)* de función C, conducen a la formación del estambre, mientras que la formación del carpelo es regulada solo por la acción de genes de función C [29]. En el MF, la actividad entre los genes de función A y los genes de función C es antagónica permitiendo la expresión verticilo específica y correcta organogénesis floral [18]. Posteriormente, el modelo ABC fue ampliado a modelo ABCDE, con genes de función D (*SEEDSTICK/AGAMOUS-LIKE11, SHATTERPROOF1* y *SHATTERPROOF2; STK/AGL11, SHP1* y *SHP2* respectivamente), que controlan el desarrollo del óvulo y genes de función E (*SEPALLATA1, SEPALLATA2, SEPALLATA3, SEPALLATA4; SEPI, SEP2, SEP3* y *SEP4* respectivamente) involucrados en la especificación de todos los tipos de órganos florales [30]. Aunque el modelo ABC ha sido confirmado en *arabidopsis* a nivel molecular, la aplicabilidad general al resto de las plantas con flores ha presentado algunos aspectos distintivos [31], específicamente en los genes con función A. Para estos genes que especifican la identidad del MF y luego de los órganos del perianto (sépalos y pétalos) no se han encontrado mutantes recesivos en los que se vean afectados ambos procesos, salvo lo reportado en *arabidopsis* [32]. Por su parte, los genes con función E han mostrado una acción redundante con los genes de función A en la identificación de órganos florales. Basado en estos antecedentes es que Causier y colaboradores reportaron el modelo (A)BC, donde los genes de función A y de función E actúan juntos en una especie de modelo combinatorio en la especificación de identidad de diferentes órganos florales [28]. El modelo (A)BC propone que los genes de función (A) = genes de función A + genes de función E y ha permitido explicar la regulación de la identidad de órganos florales de manera más amplia en diversas angiospermas [18]. Recientemente, este modelo fue actualizado a modelo (A)B(C) (siendo los genes de función (C) = genes de función C + genes de función D + genes de función E) basado en la noción de que los genes C y D están estrechamente relacionados y que derivan de genes ancestrales que combinaban la actividad de las funciones C y D [33]. En *petunia* se ha reportado que los genes de función C y D poseen actividad redundante en gran medida superpuesta [34] haciendo difícil observar la marcada división de funciones reportada en *arabidopsis* [35] y confirmando el modelo (A)B(C) (Figura 1). Es el programa genético que los factores homeóticos codificados por los genes del modelo (A)B(C) llevan

a cabo lo que permite el correcto desarrollo de los órganos que componen la flor, entre estos y de importancia para este estudio, de anteras y polen.

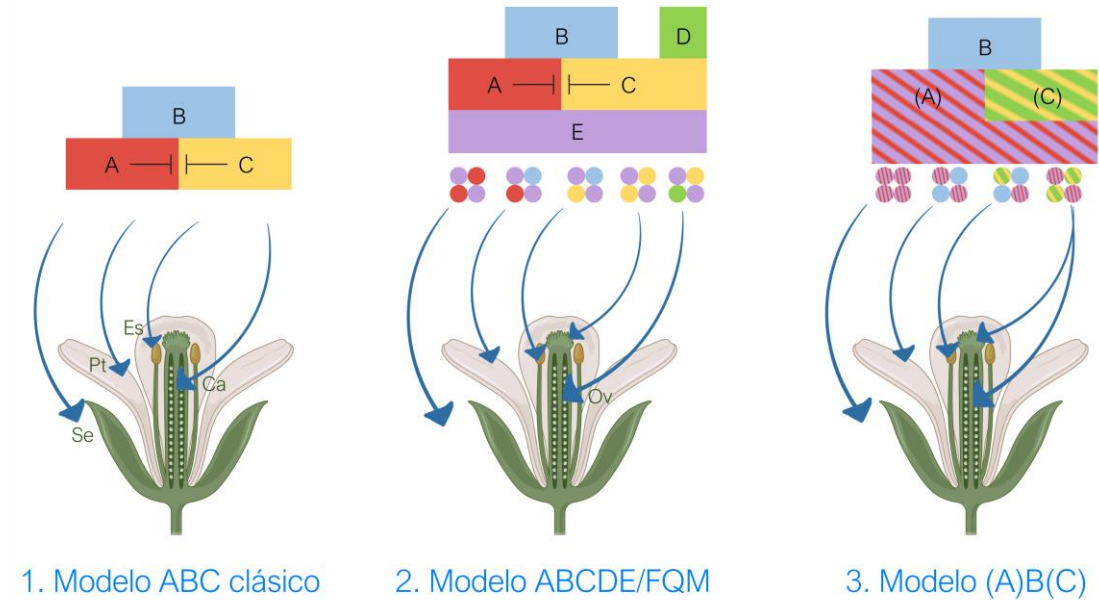


Figura 1: Modelos propuestos para el desarrollo floral en Arabidopsis. Modelos que describen las actividades combinatorias de diferentes clases de genes homeóticos, que funcionan en verticilos específicos del meristema floral para especificar la identidad de órganos. Las flechas indican los órganos/verticilos en los que están activas las diferentes clases de genes. Para los modelos 2 y 3, los complejos tetraméricos se colorean de acuerdo con las clases a las que pertenecen las proteínas. Para el modelo 3, (A) representa la consolidación de genes de clase A y E en una sola clase y (C) representa la consolidación de genes de clase C y D en una sola clase. FQM, modelo de cuarteto floral; Se, sépalos; Pt, pétalos; St, estambres; Ca, carpelo; Ov, óvulos.

Respecto a la vid, el enfoque para la comprensión de los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo reproductivo se ha basado en la identificación y análisis funcional de genes ortólogos a los descritos en modelos como Arabidopsis. Esto ha permitido aislar un número significativo de genes que podrían participar en distintos procesos o etapas del desarrollo; sin embargo, la caracterización funcional de estos genes en la vid es aún escasa ya que de la mayoría de estos candidatos solo se conocen sus perfiles expresión génica. Además, el modo de desarrollo reproductivo en la vid difiere significativamente de Arabidopsis y otras especies anuales, lo que hace de la vid, un modelo particular desde el punto de vista genético. En regiones templadas, la reproducción sexual de la vid ocurre durante dos temporadas de crecimiento. Alrededor de la primavera y el verano de la primera temporada de crecimiento, surgen de uno a tres primordios de MI dentro de las yemas latentes (inducción de la floración), estableciendo el número de MI por yema antes de entrar en latencia [1,36]. Luego, el inicio de la estación fría promueve la latencia en el proceso de floración y crecimiento mediante

fotoperiodos y temperaturas decrecientes [37]. Entrada la primavera de la segunda temporada, el brote se desarrolla y las inflorescencias inmaduras continúan la diferenciación para formar flores [38], generándose una separación estacional entre los primordios de MIs y el desarrollo de las flores. Es en este momento, después de concluir el desarrollo floral, se produce la autopolinización o polinización cruzada (dependiendo del cultivar) y consiguiente fertilización [39]. Después de la interacción polen-estigma, el grano de polen se hidrata y luego germina, elongando el tubo polínico para alcanzar el saco embrionario. Al ingresar al saco, se liberan las dos células espermáticas, fusionándose con la ovocélula y con los núcleos polares localizados en la célula central. La doble fecundación da lugar al embrión y el endospermo [40], continuando con el desarrollo frutal. De manera general, este proceso es común en las plantas con flores y gran parte de los actores que participan a nivel molecular han sido identificados en plantas modelo como *Arabidopsis*. Sin embargo, las particularidades en la biología de la vid hacen necesario confirmar lo propuesto en plantas modelo.

En la vid, se ha reportado algunos genes homólogos a lo descrito en *Arabidopsis*, como genes integradores de señales florales y genes de identidad de meristemas florales [38,41-45]. Para comprender su papel en el desarrollo, Almada y colaboradores [41] determinaron los patrones de expresión de varios de estos genes durante dos temporadas de crecimiento, abarcando eventos importantes del desarrollo como la inducción de la floración, latencia y el desarrollo de flores y frutos. La expresión de *VvICO* está coordinada espacial y temporalmente con *VviFT*, *VviMADS8* y *VFL* (los ortólogos de *FT*, *SOCT1* y *LEAFY* de *Arabidopsis*, respectivamente), lo que sugiere un papel de estos genes en la periodicidad estacional de la floración y la posible conservación en la vid de una red reguladora similar a la reportada en *Arabidopsis* [41]. Los niveles de transcripción de los genes integradores de señales florales fueron casi indetectables durante la dormancia de yemas, indicando que el mecanismo de regulación que coordina dormancia y floración en la vid ocurre como se ha descrito en otras especies de plantas [46]. Sin embargo, los genes integradores florales *VviFT* y *VFL* se inducen antes de que broten las yemas en la segunda temporada de crecimiento [41], gatillando el desarrollo floral con la activación de genes de identidad de órganos florales que determinan la morfogénesis de los mismos [1,40,47].

Los genes de identidad de órganos florales que se expresan principalmente durante el desarrollo de flores y frutos también se han caracterizado en la vid. Todos pertenecen a la familia de factores de transcripción MADS-box y fueron catalogados como genes de función B, C, D y E de acuerdo al modelo anterior ABCDE. Se han caracterizado tres homólogos de genes de función B como *VviMADS9* [38], *VviAP3* y *VviTM6* [45], renombrados de acuerdo a la reclasificación de Grimplet y colaboradores [48] como *VviPI*, *VviAP3a* y *VviAP3b* respectivamente. Los tres genes se expresan en pétalos y estambres, mientras que la expresión de *VviPI* es baja o está ausente en hojas, raíces, zarcillos, yemas latentes y bayas [38]. Además, *VviAP3b* se expresa mayoritariamente en órganos reproductivos y también se ha encontrado en carpelos, frutos y semillas. Según lo propuesto por Poupin y colaboradores [45], la expresión diferencial de *VviAP3a* y *VviAP3b* podría sugerir una posible subfuncionalización de este gen en la vid. Respecto a los genes de función C y D, estos forman un clado MADS-box

monofilético, conocido como la subfamilia *AG* de genes MADS-box [1]. En la vid se han reportado varios ortólogos putativos de la subfamilia de genes *AG*, tales como *VvMADS1*, de secuencia más cercana a *SHPI1/2* [49]; y *VvMADS5*, cercano a *STK/AGL11* [50]. Finalmente, los genes con función E identificados en la vid corresponden a *VvMADS2* (putativo homólogo de *SEP1*) y *VvMADS4* (como putativo homólogo de *SEP3*) [50]. Actualmente se dispone de información limitada sobre el desarrollo floral mediante la acción de genes específicos regulados a su vez por genes homeóticos. Estudios se han centrado en los genes que actúan río arriba y río abajo de estos reguladores maestros [51] corroborando que las redes reguladoras de genes son intrínsecamente complejas y controlada por la interacción de FTs, mecanismos epigenéticos y procesos postranscripcionales [19].

D. Las ZFP como reguladores del desarrollo del polen

El conjunto de investigación acumulada ha demostrado que el desarrollo floral implica la expresión diferencial de miles de genes, correspondiendo a casi una cuarta parte de todos los genes del genoma de *Arabidopsis* [52]. Parece que las redes de genes que controlan el desarrollo de anteras y polen son igualmente complejas, considerando que el patrón de expresión génica al menos en polen, difiere considerablemente con el de tejidos somáticos [53] y que varía durante las diferentes etapas del desarrollo [54]. Los estudios moleculares sobre este proceso en la vid son escasos y la mayor parte del análisis se ha realizado en plantas modelo. Diversos estudios han demostrado que los reguladores transcripcionales que contienen dominios MYB [55], hélice-bucle-hélice básica (bHLH) [56], MADS, dedo de Zinc (ZF) [57,58] y otros dominios de unión al ADN realizan una serie de funciones que originalmente se atribuían a factores de identidad de órganos florales. El dominio ZF es abundante en proteínas de animales, plantas, bacterias y levaduras, participando en la regulación positiva o negativa de la expresión de genes blanco. Cerca del 1% de los genes en el genoma humano codifican para proteínas con dominio ZF (casi la mitad de estos codifican para proteínas Cys₂/His₂ ZF o C2H2-ZFP) [59]. En *Arabidopsis*, aproximadamente el 0,8% de su genoma codifica para C2H2-ZFP [60], constituyendo por lo tanto, el grupo más grande de dominios de unión al ADN en las células eucariotas. Los reportes relacionan mayoritariamente a las C2H2-ZFP con la regulación de la inducción floral y el desarrollo de los órganos florales, aunque también han sido relacionadas con la regulación de la maduración de los órganos florales como anteras y polen [58]

Que el DFP esté relacionado al déficit del micronutriente zinc, y que este en la forma de ion metálico constituya la parte inorgánica de los ZFP, sugiere una relación causal entre el DFP y el funcionamiento de estas proteínas en el desarrollo reproductivo. Esto vuelve a la familia C2H2-ZFP interesante de estudiar. Sin embargo, la identificación y caracterización de esta familia de genes no ha sido investigada en la vid, por lo que parece ser el primer paso para luego comprender su participación en el desarrollo reproductivo. Esto se desarrolla en el capítulo I de este trabajo de tesis, terminando con la identificación de un grupo de genes candidatos. No obstante, para evaluar la participación de estos genes candidatos específicamente en el desarrollo del polen es necesario conocer el momento en que este evento ocurre. Considerando que

los tiempos del desarrollo reproductivo varía entre cultivares, en el capítulo II de este trabajo de tesis se localizó el desarrollo del polen, mediante microscopía y evaluación de la expresión relativa de genes del desarrollo del polen en el cultivar 'Carmenere' identificando eventos como microesporogénesis y la meiosis del polen en contraste con las escalas del desarrollo reproductivo externo. Finalmente, en el capítulo III de este trabajo de tesis, se evaluó la expresión relativa de los genes candidatos previamente identificados y se determinó la actividad de la región promotora de dos genes. Estos resultados en conjunto permiten conocer por primera vez la familia de factores de transcripción del tipo C2H2-ZFP (Familia VviZFP), y establecer sus perfiles de expresión en un contexto del desarrollo foral en *Vitis vinifera* cv. 'Carmenere'. A partir de este trabajo se pueden diseñar estrategias para caracterizar en primer lugar los genes candidatos reportados, a fin de confirmar su función en el desarrollo reproductivo y posteriormente evaluar las diferencias entre cultivares que pudieran explicar las tasas diferenciales de, por ejemplo, DFP entre cultivares.

El escrito de este trabajo de tesis se dividió en tres capítulos para su mejor comprensión:

Capítulo 1: Identificación y caracterización masiva de la familia de genes *C2H2-ZFP* en la vid (familia *VviZFP*) y selección de genes candidatos

Capítulo 2: Localización temporal del desarrollo del polen durante el proceso de desarrollo floral en *Vitis vinifera* cv. 'Carmenere'

Capítulo 3: Análisis de expresión de genes *VviZFPs* candidatos

HIPÓTESIS

Dados los antecedentes previamente expuestos se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

La regulación del desarrollo del polen involucra la participación de factores de transcripción del tipo C2H2-ZFP en *Vitis vinifera*

Objetivo General

Determinar la participación de factores de transcripción del tipo C2H2-ZFP en la red regulatoria que modula el desarrollo del polen en *Vitis vinifera*.

Objetivos específicos

1. Definir la familia de factores de transcripción del tipo C2H2-ZFP en *V. vinifera* (familia *VviZFP*) y los miembros putativamente involucrados en la regulación del desarrollo del polen

Se busca identificar la familia de genes *C2H2-ZFP* en la vid (*VviZFP*) en base a la identificación *in silico* de secuencias con dominios característicos de dichas moléculas. Luego se plantea la identificación de genes candidatos en base al análisis de expresión *in silico* y la identidad con genes descritos en otras especies modelo.

2. Localizar el desarrollo del polen dentro del proceso del desarrollo floral en *V. vinifera* cv 'Carmenere'

Se propone dar cumplimiento a este objetivo mediante la caracterización fenológica de un set de muestras de *V. vinifera* cv 'Carmenere' que consideren el desarrollo floral en la segunda temporada de crecimiento. Además, la identificación de estado del desarrollo del polen en esas muestras mediante microscopia y el análisis de expresión relativa de genes homeóticos y putativos ortólogos a los ya relacionados a este proceso en otros modelos vegetales.

3. Establecer los perfiles de expresión espacio-temporal de los genes *VviZFP* candidatos durante las diferentes etapas del desarrollo de flores de *Vitis vinifera*.

Se proponen análisis de qRT-PCR de genes candidatos para determinar la dinámica en los niveles de expresión relativa durante el desarrollo floral. Por otro lado, mediante la generación de líneas transgénicas de *Nicotiana benthamiana promVviZFP::GUS* se busca determinar la especificidad de tejido en la expresión de los genes candidatos.

Capítulo I: Identificación y caracterización masiva de la familia de genes *C2H2-ZFP* en la vid (familia *VviZFP*) y selección de genes candidatos

1.1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo reproductivo en las plantas es un proceso altamente regulado donde se ha demostrado que los factores de transcripción (TF) tienen un rol fundamental. En *Arabidopsis* [61], la familia más abundante de reguladores transcripcionales contiene uno o más dominios dedos de zinc (*zinc-finger domain*, ZF) y por esta razón, se denominan proteínas dedos de zinc (*zinc-finger proteins*, ZFP).

En el dominio ZF, un ion de zinc está coordinado por residuos de cisteína (C) y/o histidina (H) que conforman una estructura tridimensional con forma de dedo. Las ZFPs se clasifican según el número y la ubicación de los residuos C y H en los dominios ZF [62]. Las C2H2-ZFPs poseen dominios de 25 a 30 residuos de aminoácidos con dos residuos de C y dos de H conservados en ambos extremos del dominio que coordinan tetraédricamente un átomo de zinc para formar una estructura compacta que contiene una β -horquilla y una α -hélice, siendo esta última la región de contacto con el ADN (Figura 2). La localización de los genes blanco reconocidos por el dominio C2H2-ZF es específica y a la vez diversa [58]. A diferencia de otras clases estructurales de dominios de unión a ADN (con un rango limitado de especificidad), los dominios C2H2-ZF pueden identificar un amplio rango de secuencias *in cis*, con alta especificidad, basado en un código de tres pares de bases [63,64]. Se ha observado que dominios C2H2-ZF con secuencias completamente diferentes pueden identificar sitios de unión de ADN similares, y que dominios con secuencias similares pueden divergir en sus preferencias [65].

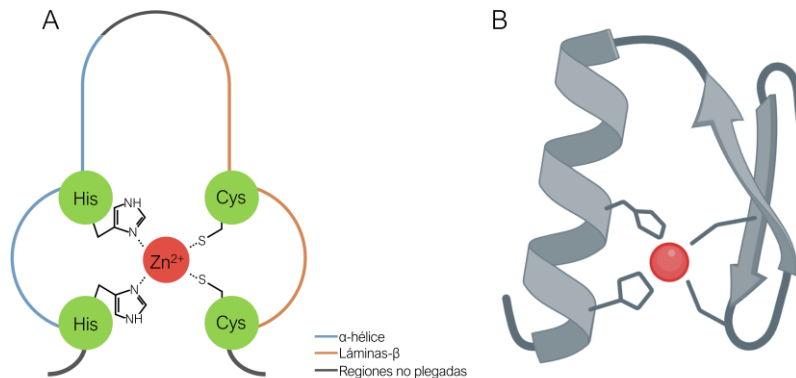


Figura 2: Estructura primaria (A) y secundaria (B) de los dominios C2H2-ZF. Los puntos rojos representan el átomo de zinc, el espiral denota la α -hélice y las flechas antiparalelas indican las láminas- β plegadas. desde la α -hélice se extienden los dos anillos de imidazol de histidina y desde las hojas beta se extienden los dos grupos tiol de los residuos de cisteína.

Estas proteínas, denominadas también ZFP tipo TF3A o ZFP tipo Krüppel, pueden interactuar además con ARN y proteínas, participando no solo en la regulación de la expresión de genes sino también en la regulación de la cromatina y

en el metabolismo del ARN [58]. Dicha versatilidad se expresa en la diversidad de funciones biológicas que estas proteínas desempeñan.

Las C2H2-ZFP se clasifican generalmente con un enfoque de clasificación intuitivo y sencillo, basado en cuatro estructuras: La posición de dominios ZF (en tándem o dispersos) [61,66], las regiones espaciadoras entre dominios ZF [67], el número de dominios ZF [60] y la presencia del motivo QALGGH en los dominios ZF [13]. Sobre esta clasificación, la familia C2H2-ZFP en *arabidopsis* se agrupa en tres sets: A, B y C. El estudio en *arabidopsis* se ha dirigido a los dos sub-sets A1 y C1, de mayor tamaño, evolutivamente más jóvenes y principalmente relacionados con la regulación transcripcional. El sub-set A1 incluye proteínas con dominios C2H2-ZF dispuestos en tándem en un arreglo. Por su parte, el sub-set C1 integra proteínas con un dominio C2H2-ZF aislado o de dos a cinco dominios C2H2-ZF dispersos, conservando de manera característica la secuencia QALGGH en la α -hélice del dominio. Este sub-set ha sido identificado de manera análoga como familia EPF en *petunia* [67,68]. En el papel del desarrollo floral de *arabidopsis*, las C2H2-ZFP presentan diversas estructuras y pertenecen a diferentes sub-sets. Por ejemplo, los genes *EARLY FLOWERING6 (ELF6)* y *RELATIVE OF EARLY FLOWERING6 (REF6)*, que participan en la inducción de la floración, son miembros del sub-set A2. CSZ, una histona metiltransferasa con dominio SET, y los FTs *SUPPRESSOR OF FRIGIDA4 (SUF4)* y *LATE FLOWERING (LATE)* también participan en la inducción de la floración y pertenecen a los subconjuntos A3, A4 y C1, respectivamente. *SUPERMAN (SUP)*, *KNUCKLES (KNU)*, *RABBIT EARS (RBE)* y *JAGGED (JAG)*, regulan el desarrollo de los órganos florales y se distribuyen principalmente en el subconjunto C1. En otros modelos como arroz, las C2H2-ZFP poseen dos tipos principales de dominios C2H2-ZF (denominados C y Q). La caracterización de esta familia en distintos organismos reveló la presencia exclusiva en plantas de un grupo de C2H2-ZFP denominadas tipo Q (*Q-type*), cuya principal característica es una secuencia de aminoácidos invariante (QALGGH) dentro de la superficie de contacto con el ADN en el dominio C2H2-ZF. El que este tipo particular de dominios C2H2-ZF no haya sido reportado en otros organismos, sugiere que las C2H2-ZFP tipo Q podrían estar regulando procesos únicos de la vida vegetal [69,70].

Dentro de la familia de ZFPs se ha identificado un conjunto de ellos con actividad represora de la transcripción en diferentes especies, incluidas *arabidopsis*, trigo (*Triticum aestivum* L.), *petunia* y *soya (Glycine max* L.). Característico de este grupo de proteínas es la presencia de un motivo proteico denominado motivo de represión anfifílica asociada a elementos de respuesta a Etileno (*Ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic represión, EAR-motif*). De manera general (pero no exclusiva), el motivo EAR se localiza en la región C-terminal y contiene la secuencia consenso conservada L/FDLNLF(x)P [71]. La comparación de secuencias de los motivos EAR de estas proteínas en *arabidopsis* [72] reveló dos patrones distintos: LxLxL (X puede ser uno de los 20 aminoácidos comunes), que contiene tres residuos Leu en posiciones conservadas; y DLNxxP, que consiste en un caja DLN conservada y un residuo Pro en la quinta o sexta posición. Los residuos de Asp y Leu han demostrado estar implicados en la actividad represora de la transcripción [71,73,74]. La

mutación/delección del motivo EAR en las proteínas ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS10 (ZAT10) [75], ZAT11 [76], DAZ1 y DAZ2 [77] inhibió la capacidad represora, respaldando la importancia del motivo EAR en la función biológica de estas C2H2-ZFPs.

En la vid, algunos cultivares (como Carmenere, Malbec o Merlot) exhiben una alta tendencia al desarrollo de frutos partenocárpicos, afectando negativamente los rasgos de calidad de fruto. Ya que Alva y colaboradores (2015) reportaron que en estos cultivares de vid, la tasa de DFP se correlaciona directamente con la tasa de polen anormal, es posible plantear que la fertilización defectuosa del óvulo podría ser causada por un polen con desarrollo anormal generado por desbalances en la regulación de este proceso.

Dado que las particularidades de la regulación del desarrollo del polen a nivel molecular en la vid son actualmente desconocidas y considerando el rol descrito para algunas C2H2-ZFPs en este proceso; la identificación de los genes *C2H2-ZFP* que regulen la formación de polen en la vid se vuelve prioritario de investigar. Sin embargo, hasta ahora, no hay información sobre el papel de las *C2H2-ZFP* en la vid ni sobre su posible participación en la integración de las vías de regulación de la formación de polen. En este contexto, se propone en el capítulo I de este trabajo de tesis la identificación y caracterización masiva de la familia de genes *ZFP* para la posterior selección de candidatos, útiles para el cumplimiento de los objetivos posteriores.

Objetivo específico a desarrollar:

1. Definir la familia de factores de transcripción del tipo C2H2-ZFP en *V. vinifera* (familia *VviZFP*) y los miembros putativamente involucrados en la regulación del desarrollo del polen

Se busca identificar la familia de genes *C2H2-ZFP* en la vid (*VviZFP*) en base a la identificación *in silico* de secuencias con dominios característicos de dichas moléculas. Luego se plantea la identificación de genes candidatos en base al análisis de expresión *in silico* y la identidad con secuencias descritas en otras especies modelo.

1.2 METODOLOGÍA

1.2.1 Identificación de Factores de Transcripción tipo C2H2 zinc-finger en *Vitis vinifera*

Las secuencias genómicas, codificante y de aminoácidos fueron obtenidas del ensamblaje del genoma de la vid versión 12X.v2 (con el archivo de anotación versión VCost.v3) [78], alojado por la unidad de investigación URGI (<https://urgi.versailles.inra.fr/Species/Vitis>). La identificación de las C2H2-ZFP (VviZFP) se realizó sobre el proteoma deducido de la vid utilizando el paquete HMMer v3.1b2 [79] y el perfil Pfam dominio ZF-C2H2 HMM (PF00096) [80]. Luego, todas las secuencias obtenidas fueron validadas mediante análisis de dominios conservados utilizando el software SMART [81] e InterProScan [82] con parámetros predeterminados. Las secuencias de proteínas que carecían del dominio C2H2 ZF fueron descartadas.

1.2.2 Determinación de localización cromosómica y estructura génica

Las coordenadas genómicas de los genes que codifican para VviZFPs en la vid se extrajeron desde el archivo *General Feature Format 3* (GFF3). Los genes identificados fueron renombrados desde *VviZFP1* a *VviZFP94*, basados en la distribución lineal de los genes en los 19 cromosomas. Para mapear y visualizar los genes VviZFP en los cromosomas (a través de un ideograma) se utilizó el paquete R *RIdeogram* versión 0.2.2 [83]. Con el programa *Gene Structure Display Server 2.0* [84] se determinó la organización intrón/exón alineando la región codificante (*CDS* por *Coding Sequence*) con su correspondiente secuencia genómica.

1.2.3 Análisis filogenético e identificación de motivos conservados en secuencias aminoacídicas

Los alineamientos múltiples de secuencias de proteínas se realizaron en el programa Clustal Omega con parámetros predeterminados [85,86]. El análisis filogenético se realizó con el software MEGA X (versión 10.2.2) [87] mediante el método *Neighbor-Joining* [88] y la fiabilidad del análisis se evaluó con el método de remuestreo *Bootstrap* usando 1000 repeticiones. La predicción de la localización subcelular de las proteínas codificadas se realizó en el software CELLO v2.5 [89] y la predicción de secuencias de localización nuclear (NLS) específicas para la ruta dependiente de $\alpha\beta$ -importina se obtuvo en *cNLS mapper* [90] filtrando aquellos con puntuación ≥ 7 . La detección de motivos conservados entre los dominios ZF se realizó con la herramienta *Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation* (MEME) [91] y la caracterización y clasificación de VviZFP con motivos EAR (llamado represoma VviZFP) se realizó de acuerdo a [72]. El peso molecular y el punto isoeléctrico teórico fueron calculados con la herramienta ProtParam [92]. Finalmente, los VviZFP se posicionaron en los sets A, B o C de acuerdo con la clasificación reportada en [58].

1.2.4 Análisis de duplicación génica

Las duplicaciones de genes (o búsqueda de genes parálogos) fueron predichas en *tBLASTn* con los parámetros predeterminados. Cada uno de los 98 genes *VviZFP* fueron alineados contra las secuencias cromosómicas de *V. vinifera* y los resultados se analizaron con el software *Multiple-alignment Viewer (Mview)* [93]. *Mview* identifica las alineaciones locales con más de un segmento con alta puntuación de apareamiento (*High-scoring segment pair, HSP*) utilizando criterios de filtrado. Los criterios utilizados fueron: porcentaje de identidad superior al 30% y porcentaje de cobertura total superior al 70% [94,95]. Además, se consideró un *e-value* inferior a 0,00001 (en lugar de inferior a 1) de acuerdo con [94] (Figura 3. A). Las secuencias parálogas identificadas en el análisis fueron representadas a través de un *Circos-plot* con el software *Circos* [96]. Además, se buscaron eventos de duplicación en tándem de genes *VviZFP* entre los cromosomas de la vid según [97], donde una región cromosómica dentro de 200 kb que contiene dos o más genes se consideró como evento de duplicación en tándem.

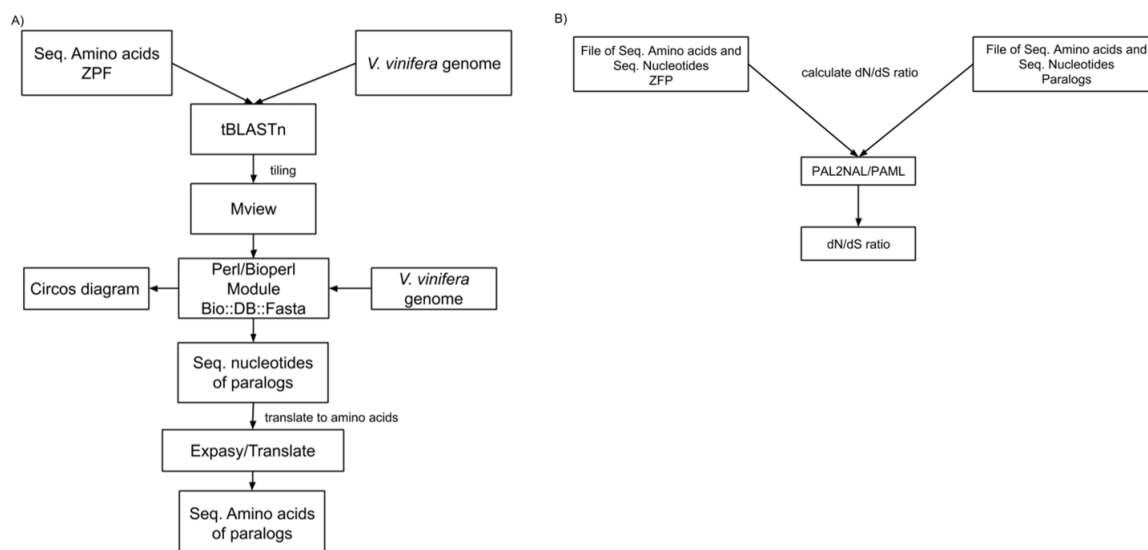


Figura 3. Diagrama del flujo de trabajo (*pipeline*) utilizado. (A) *Pipeline* para la obtención del diagrama Circos. Además, se generaron los archivos con las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los parálogos para el cálculo de dN/dS. (B) *Pipeline* para el cálculo de dN/dS entre pares de secuencias conformados por cada *VviZFP* y sus respectivos parálogos.

1.2.5 Cálculo de la relación dN/dS

El cálculo de la relación dN/dS se realizó para cada par de genes parálogos, donde el primero corresponde al gen *VviZFP* y el segundo a la duplicación encontrada para dicho gen. El cálculo fue realizado por el módulo *codeml* del software *PAML* [98] (Figura Suplementaria 1). Conceptualmente, el cálculo de la relación dN/dS consiste en la razón entre el número de sustituciones no sinónimas y el número de sustituciones sinónimas entre un par de secuencias de ARN mensajero que pueden traducirse eventualmente en la misma secuencia de proteínas. La obtención y manejo de secuencias parálogas

desde el genoma se realizó mediante un script Perl con el módulo Bioperl Bio::DB::Fasta. Las secuencias de proteínas finales se verificaron manualmente usando la herramienta de traducción de ADN de ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) antes de su entrada a PAL2NAL.

Para el cálculo de dN/dS en la plataforma PAL2NAL [99] se utilizaron dos archivos, el primero conteniendo las secuencias de nucleótidos (ADN o ARN) del gen y su putativo parálogo, y el segundo archivo conteniendo la secuencia de aminoácidos traducida por ambos (gen-parálogo). Finalmente, ambos archivos fueron cargados en PAL2NAL y se calculó la relación dN/dS de cada par de secuencias (Figura 3. B).

1.2.6 Análisis de enriquecimiento de términos de Gene Ontology (GO)

La agrupación funcional de los genes *VviZFP* basada en términos de Ontología Génica (GO) se ejecutó con la herramienta AgriGO v2 [100] realizando un análisis de enriquecimiento singular (*Singular-Enrichment analysis, SEA*) utilizando como referencia la base de datos *grape transcript ID (Grape Genome database)*. Se describen los términos más enriquecidos dentro de los primeros 3 niveles de clasificación GO: Proceso Biológico (PB), Función molecular (FM) y Componente Celular (CC). Se indica el nivel de enriquecimiento del término GO y el número relativo de genes por categorías.

1.2.7 Perfiles de expresión génica *in silico* y agrupación por k-medias de genes *VviZFP*

Los datos de expresión de genes *VviZFP* se obtuvieron desde la base de datos de microarreglos del *Grape eFP Browser* (http://bar.utoronto.ca/efp_grape/cgi-bin/efpWeb.cgi), con 54 muestras que incluyen tejidos y órganos verdes y leñosos en diferentes etapas de desarrollo de *V. vinifera* cv. 'Corvina' [101]. Los datos de expresión obtenidos se normalizaron en función de la media entre los valores de expresión de cada gen en todas las muestras analizadas mediante la transformación por *Z-score* [102]. La similitud en la expresión entre genes *VviZFP* se calculó mediante análisis de correlación de Pearson y el agrupamiento se realizó con un ensayo de agrupamiento jerárquico del tipo *average-linkage*. El valor de k (comprendido como el número de grupos o *clusters*) se determinó mediante un cálculo de la Figura de Mérito (*Figure of Merit, FOM*). La transformación de datos, agrupación y figuras se generaron en el software MultiExperiment Viewer [103].

1.3 RESULTADOS

Para la identificación de la familia de C2H2-ZFP en la vid (Familia VviZFP), se realizó una búsqueda con un modelo oculto de Márkov o (Hidden Markov Model, HMM) [79] utilizando el paquete de software HMMER v3.1b2. Se encontraron 101 C2H2-ZFPs en el proteoma deducido y el análisis SMART confirmó la presencia del dominio C2H2-ZF en 98 de estas (Tabla 1). Todos los miembros de la familia fueron renombrados desde *VviZFP1* a *VviZFP98* (Ver Materiales y Métodos, sección 1.2.2).

Tabla 1. La familia de genes *VviZFP* e información relacionada a la secuencia genómica y el producto proteico. Cr, cromosoma; In, coordenada inicial; Fn, coordenada final; Ca, cadena del ADN; No. AA, tamaño de la proteína en aminoácidos; PM, Peso Molecular; PIT, punto isoeléctrico teórico; SET, clasificación de la proteína en set A, B o C de acuerdo a [58]; LS, Localización Subcelular.

ID ZFP [104]	URGL_ID	Cr	In	Fn	Ca	No. AA	PM	PIT	SET	LS
VviZFP1	Vitvi01g00063.t01	chr1	615426	618157	+	522	57541,7	8,82	C	Nuclear
VviZFP2	Vitvi01g00098.t01	chr1	1071683	1078380	-	375	40096,95	7,2	A	Nuclear
VviZFP3	Vitvi01g00247.t01	chr1	2770614	2771915	-	275	30461,02	8,11	A	Nuclear
VviZFP4	Vitvi01g00529.t01	chr1	6006079	6010245	+	246	26776,9	5,43	C	Nuclear
VviZFP5	Vitvi01g00552.t01	chr1	6214495	6217248	+	425	47126,1	8,69	A	Nuclear
VviZFP6	Vitvi01g02054.t01	chr1	8144936	8145353	-	138	15564,02	4,2	A	Nuclear
VviZFP7	Vitvi01g00845.t01	chr1	10117666	10118410	-	247	27640,8	7,63	C	Nuclear
VviZFP8	Vitvi01g01492.t01	chr1	20211884	20216358	+	587	63397,38	9,42	A	Nuclear
VviZFP9	Vitvi01g01493.t01	chr1	20240277	20243679	-	603	65205,18	9,04	A	Nuclear
VviZFP10	Vitvi02g00488.t01	chr2	4599267	4604503	+	231	26915,07	10,3	C	Mitochondrial
VviZFP11	Vitvi02g00560.t01	chr2	5391526	5392771	-	335	37042,14	5,87	C	Nuclear
VviZFP12	Vitvi02g00686.t01	chr2	7353832	7354585	+	250	27324,01	4,96	C	Nuclear
VviZFP13	Vitvi03g00230.t01	chr3	2660930	2662153	+	322	35038,46	7,57	C	Nuclear
VviZFP14	Vitvi03g00630.t01	chr3	7125339	7126334	-	235	25656,66	8,53	C	Nuclear
VviZFP15	Vitvi03g00904.t01	chr3	12298105	12299937	-	117	12020,21	9,3	C	Nuclear
VviZFP16	Vitvi03g01277.t01	chr3	20161356	20161582	+	74	8945,61	9,57	C	Nuclear
VviZFP17	Vitvi03g01280.t01	chr3	20180702	20183375	+	134	15409,05	9,53	A	Nuclear
VviZFP18	Vitvi03g01287.t01	chr3	20260312	20271158	+	367	39307,78	7,15	A	Nuclear
VviZFP19	Vitvi04g00096.t01	chr4	953847	956954	+	526	56983,88	8,95	A	Nuclear
VviZFP20	Vitvi04g00219.t01	chr4	2093590	2097352	+	411	46574,32	5,67	C	Nuclear
VviZFP21	Vitvi04g00527.t01	chr4	5629987	5631119	+	286	31544,12	5,96	C	Nuclear
VviZFP22	Vitvi04g01252.t01	chr4	18300470	18303536	-	596	53124,88	8,77	A	Nuclear
VviZFP23	Vitvi04g02200.t01	chr4	21479409	21480660	+	330	34727,61	5,65	C	Nuclear
VviZFP24	Vitvi05g00082.t01	chr5	782615	783734	+	236	25450,32	8,87	C	Nuclear

Tabla 1. Continuación (2)

ID ZFP [104]	URGL_ID	Cr	In	Fn	Ca	No. AA	PM	PIT	SET	LS
VviZFP25	Vitvi05g01913.t01	chr5	7082196	7083404	+	228	25470,51	8,72	C	Nuclear
VviZFP26	Vitvi05g01914.t01	chr5	7094681	7095305	+	207	23008,67	6,21	C	Nuclear
VviZFP27	Vitvi05g01915.t01	chr5	7102339	7103470	+	178	20359,12	6,97	C	Nuclear
VviZFP28	Vitvi06g00195.t01	chr6	2295975	2298207	-	334	37720,09	6,9	A	Nuclear
VviZFP29	Vitvi06g00304.t01	chr6	3815582	3818471	-	527	58042,27	9,3	A	Nuclear
VviZFP30	Vitvi06g01682.t01	chr6	5152340	5153166	+	159	17811,68	9,15	C	Nuclear
VviZFP31	Vitvi06g01710.t01	chr6	6156544	6157123	-	192	20968,39	6,9	C	Nuclear
VviZFP32	Vitvi06g00521.t01	chr6	6160245	6161494	-	272	30657,63	9,19	C	Nuclear
VviZFP33	Vitvi06g00607.t01	chr6	7023947	7025451	+	386	42932,03	8,77	C	Nuclear
VviZFP34	Vitvi06g01861.t01	chr6	15984585	15985551	+	321	36330,43	5,78	C	Nuclear
VviZFP35	Vitvi06g01862.t01	chr6	16106654	16107980	+	441	48569,67	9,58	C	Nuclear
VviZFP36	Vitvi06g01864.t01	chr6	16114126	16115392	+	421	45557,15	9,08	C	Nuclear
VviZFP37	Vitvi06g01865.t01	chr6	16127358	16128711	+	450	49058,13	9,49	C	Nuclear
VviZFP38	Vitvi06g01866.t01	chr6	16130243	16131632	+	462	50164,48	9,31	C	Nuclear
VviZFP39	Vitvi06g01867.t01	chr6	16138323	16139773	+	426	45964,15	8,68	C	Nuclear
VviZFP40	Vitvi06g01350.t01	chr6	19424631	19425863	+	296	31762,16	6,27	C	Nuclear
VviZFP41	Vitvi06g01353.t01	chr6	19449611	19451078	+	390	43042,83	8,63	A	Nuclear
VviZFP42	Vitvi06g01399.t01	chr6	20179149	20184868	-	300	32494,59	4,73	C	Nuclear
VviZFP43	Vitvi06g01471.t01	chr6	21201969	21205149	-	347	39207,37	8,97	A	Nuclear
VviZFP44	Vitvi07g00077.t01	chr7	898938	902809	-	468	51197,43	9,06	C	Nuclear
VviZFP45	Vitvi07g00171.t01	chr7	2042674	2051220	-	376	43270,38	7,56	A	Nuclear
VviZFP46	Vitvi07g00271.t01	chr7	3001328	3004290	-	598	65194,66	8,83	A	Nuclear
VviZFP47	Vitvi07g02261.t01	chr7	6169960	6170679	+	179	20072,36	9,17	C	Nuclear
VviZFP48	Vitvi07g02262.t01	chr7	6175930	6176615	+	175	19739,77	4,79	C	Nuclear
VviZFP49	Vitvi07g01366.t01	chr7	19122151	19123693	-	393	43396,17	5,9	C	Nuclear
VviZFP50	Vitvi07g01602.t01	chr7	21814185	21815250	+	233	25007,84	7,22	C	Nuclear
VviZFP51	Vitvi07g01724.t01	chr7	22918976	22919867	+	296	31837,31	6,87	C	Nuclear
VviZFP52	Vitvi08g00893.t01	chr8	11202773	11205691	-	370	42941,13	8,9	B	Nuclear
VviZFP53	Vitvi08g02113.t01	chr8	11710331	11711297	-	321	34967,55	8,99	C	Nuclear
VviZFP54	Vitvi08g01050.t01	chr8	13208945	13211623	-	492	53203,99	9,23	A	Nuclear
VviZFP55	Vitvi08g02203.t01	chr8	15040330	15040891	-	186	20527,68	5,82	C	Nuclear
VviZFP56	Vitvi08g01518.t01	chr8	17962860	17967084	+	320	35100,3	4,95	C	Nuclear
VviZFP57	Vitvi08g01600.t01	chr8	18752390	18753712	-	276	30176,53	6,37	C	Nuclear
VviZFP58	Vitvi08g01869.t01	chr8	21424109	21426800	-	345	38767,34	6,95	C	Nuclear
VviZFP59	Vitvi08g01895.t01	chr8	21708520	21711265	-	293	32457,78	8,56	C	Nuclear

Tabla 1. Continuación (3)

ID ZFP [104]	URGL_ID	Cr	In	Fn	Ca	No. AA	PM	PIT	SET	LS
VviZFP60	Vitvi08g01953.t01	chr8	22374267	22384011	-	595	67857,67	5,39	C	Nuclear
VviZFP61	Vitvi09g00191.t01	chr9	2108410	2110849	-	532	57218,91	9,22	A	Nuclear
VviZFP62	Vitvi09g00827.t01	chr9	10638543	10639768	-	267	29405,59	7,13	C	Nuclear
VviZFP63	Vitvi09g01479.t01	chr9	22904523	22906281	+	462	50540,52	8,66	A	Nuclear
VviZFP64	Vitvi10g00290.t01	chr10	2942983	2945119	-	418	44646,02	9,43	C	Nuclear
VviZFP65	Vitvi11g01259.t01	chr11	19168180	19169708	-	154	17251,04	7,91	C	Nuclear
VviZFP66	Vitvi12g00252.t01	chr12	3777953	3780464	+	454	50112,54	9,22	A	Nuclear
VviZFP67	Vitvi12g02001.t01	chr12	21652236	21674296	-	371	42466,31	6,07	A	Nuclear
VviZFP68	Vitvi13g00262.t01	chr13	2601842	2602358	+	171	18579,3	8,94	C	Nuclear
VviZFP69	Vitvi13g00340.t01	chr13	3534102	3534951	+	282	30817,44	6,86	C	Nuclear
VviZFP70	Vitvi13g00630.t01	chr13	6062014	6068516	+	1094	121222,3	5,72	A	Nuclear
VviZFP71	Vitvi13g00694.t01	chr13	7103692	7105517	+	302	33185,9	6	C	Nuclear
VviZFP72	Vitvi13g01403.t01	chr13	21882559	21883438	+	292	31989,69	7,76	C	Nuclear
VviZFP73	Vitvi13g01748.t01	chr13	27636321	27639709	+	343	38532,49	7,55	C	Nuclear
VviZFP74	Vitvi14g00197.t01	chr14	2059340	2063214	-	531	58001,95	9,07	A	Nuclear
VviZFP75	Vitvi14g02957.t01	chr14	25180495	25180891	-	131	14349,07	8,69	C	Nuclear
VviZFP76	Vitvi14g01533.t01	chr14	25599287	25604377	+	253	28773,49	8,98	A	Nuclear
VviZFP77	Vitvi14g01770.t01	chr14	27753527	27758395	+	351	40072,89	8,5	A	Nuclear
VviZFP78	Vitvi14g01822.t01	chr14	28162608	28163648	-	240	27027,55	8,89	C	Nuclear
VviZFP79	Vitvi14g02033.t01	chr14	30116791	30119257	-	570	63751,87	6,32	A	Nuclear
VviZFP80	Vitvi15g00644.t01	chr15	13742186	13744151	+	466	50932,92	6,76	C	Nuclear
VviZFP81	Vitvi15g01472.t01	chr15	13755692	13757195	+	359	40177,6	5,36	C	Nuclear
VviZFP82	Vitvi16g00499.t01	chr16	9138585	9139293	+	235	26341,58	8,77	C	Nuclear
VviZFP83	Vitvi16g01067.t01	chr16	19160899	19168317	+	703	77595,7	8,76	C	Nuclear
VviZFP84	Vitvi16g01919.t01	chr16	19531230	19532948	-	274	30979,27	9,54	A	Nuclear
VviZFP85	Vitvi17g00157.t01	chr17	1568333	1570911	+	455	51137,48	8,94	A	Nuclear
VviZFP86	Vitvi17g00670.t01	chr17	7606404	7609435	+	562	62202,34	8,63	C	Nuclear
VviZFP87	Vitvi17g01488.t01	chr17	7633415	7639255	+	424	45790,35	9,44	C	Nuclear
VviZFP88	Vitvi17g01001.t01	chr17	12110501	12124859	+	1329	148429,94	8,64	A	Nuclear
VviZFP89	Vitvi17g01024.t01	chr17	12498532	12507339	+	276	31460,15	8,89	C	Nuclear
VviZFP90	Vitvi18g00316.t01	chr18	3422175	3424287	-	489	53704,79	9,5	C	Nuclear
VviZFP91	Vitvi18g00417.t01	chr18	4531168	4532101	+	273	30529,9	8,99	A	Extracelular
VviZFP92	Vitvi18g00675.t01	chr18	7732626	7733603	+	233	25291,37	8,91	C	Nuclear
VviZFP93	Vitvi18g00755.t01	chr18	8481199	8483315	+	444	50720,36	6,55	C	Nuclear
VviZFP94	Vitvi18g00935.t01	chr18	10395328	10398495	-	503	52706,5	9,18	A	Nuclear

Tabla 1. Continuación (4)

ID ZFP [104]	URGL_ID	Cr	In	Fn	Ca	No. AA	PM	PIT	SET	LS
VviZFP95	Vitvi18g01109.t01	chr18	12179699	12181575	+	399	43496,21	9,21	C	Nuclear
VviZFP96	Vitvi18g01662.t01	chr18	23151968	23155987	-	527	58021,9	6,03	A	Nuclear
VviZFP97	Vitvi19g00397.t01	chr19	5329127	5331078	-	429	46411,09	9,31	C	Nuclear
VviZFP98	Vitvi19g00912.t01	chr19	10502955	10505661	+	595	64557,73	6,66	C	Nuclear

1.3.1 Caracterización general y clasificación de la familia VviZFP

En términos generales, los miembros de la familia *VviZFP* presentaron una alta heterogeneidad en la mayoría de los parámetros evaluados. La longitud de las proteínas es diversa, siendo VviZFP16 (74 aminoácidos) la más pequeña y VviZFP88 (1329 aminoácidos) la secuencia de mayor longitud. El análisis de las propiedades fisicoquímicas indicó un rango de variación en el peso molecular (8.9–148.4 kDa) y el punto isoelectrico (4.2–10.3) (Tabla 1). La predicción de la localización subcelular señala que 96 VviZFPs podrían localizarse en el núcleo, lo que es consistente con lo reportado para este grupo de proteínas. El mismo análisis determinó que VviZFP10 podría ubicarse en las mitocondrias mientras que VviZFP91 podría localizarse en el espacio extracelular.

Para clasificar esta familia, las VviZFPs con dominios C2H2-ZF en tándem en un arreglo o en más de un arreglo fueron asignados al set A y B respectivamente. Las VviZFPs con solo un dominio C2H2-ZF o con dominios dispuestos de manera dispersa se asignaron al set C (Figura 4a). El 33% de los VviZFPs corresponden al set A con 32 proteínas que poseen dominios C2H2-ZF en arreglos, el 1% corresponde al set B con una proteína con más de un arreglo de dominios C2H2-ZF y el 66% corresponde al set C con 65 proteínas que poseen solo un dominio C2H2-ZF o más de uno dispersos. La familia VviZFP posee de 1 a 9 dominios C2H2-ZF por proteína. El logo de secuencia (Figura 4b) muestra el grado de conservación entre los motivos C2H2-ZF por set en la familia VviZFP. En el set A, la posición de las dos cisteínas y una histidina se conservan en gran medida, pero varía la posición del segundo residuo de histidina. En *Arabidopsis*, la distancia entre las dos histidinas en la familia A1 ZFP varió de 3, 4, 6 o 7 residuos [1]. En las proteínas del set C, la secuencia QALGGH (específica de dominios ZF en plantas) en la posición de 2-7 de la hélice se mantiene altamente conservada.

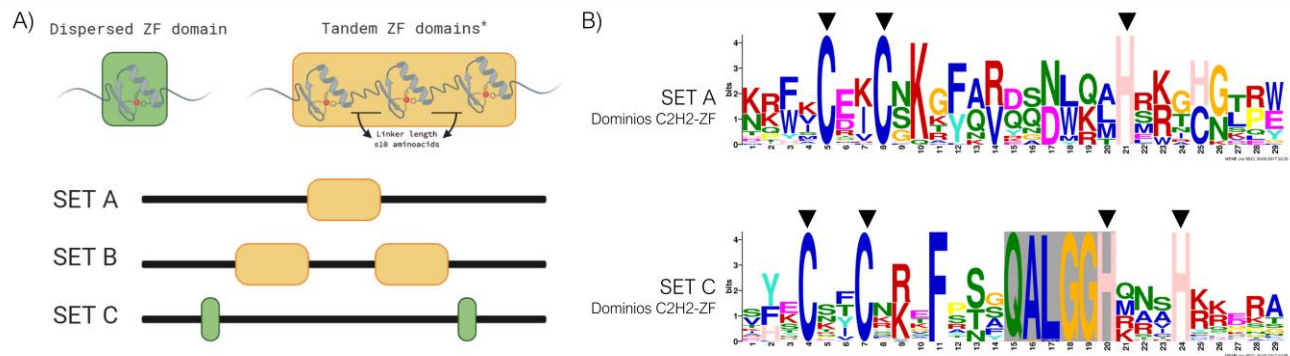


Figura 4. Representación gráfica del criterio usado para clasificar los VviZFPs y del nivel de conservación de secuencias entre sus dominios C2H2-ZF. En (A) Los arreglos de dominios C2H2-ZF están compuestos por dominios dispuestos en tándem unidos por 0 a 10 residuos de aminoácidos, siendo 5 residuos lo más frecuente [60]. Las VviZFPs en el set A poseen un arreglo de dominios C2H2-ZF y las VviZFPs en el set B poseen más de un arreglo con dominios C2H2-ZF en tándem. Las VviZFPs de ambos grupos pueden presentar otros dominios C2H2-ZF dispersos además de los que componen los arreglos. Las VviZFPs en el set C poseen uno o más dominios C2H2-ZF dispersos (La posición de los dominios en la figura es ilustrativa, para conocer la estructura génica y proteica ver Figura 6 y Figura 7). * Los arreglos de C2H2-ZF en la vid están compuestos por entre dos a cuatro dominios. Creado con BioRender.com. En (B) el logo de secuencias para los dominios C2H2-ZF por set. El eje X representa la posición de la secuencia en el dominio C2H2-ZF y el eje Y representa el contenido de información medido en bits. El logo de secuencias fue derivado a partir de la secuencia peptídica del dominio en el software MEME suite [91]

VviZFP53 es la única proteína clasificada en el set B y posee 9 dominios C2H2-ZF organizados en tres arreglos a través de la secuencia (Figura 5). La secuencia aminoácida de VviZFP52 comparte un 58.6% de identidad de secuencia con el factor de transcripción IIIA (TFIIIA, AT1G72050.2) y un 66.3% con la secuencia Solyc10g077110.1.1 de *Solanum lycopersicum* L., lo que sugiere que en la vid también existe un ortólogo del gen que codifica para TFIIIA (Figura 5. A). En Arabidopsis, esta proteína posee 9 dominios C2H2-ZF y regula positivamente la transcripción de genes de ARN ribosomal 5S, siendo además conservada entre taxas [105]. La búsqueda por BLAST en otras especies de plantas reveló homólogos a TFIIIA en otros genomas vegetales. El análisis de secuencias de genes indicó que VviZFP52 contiene nueve dominios ZF de C2H2, similares a Arabidopsis TFIIIA, y otros homólogos de TFIIIA de plantas (Figura 5 B). El análisis filogenético y de similitud de secuencia mostró que todos los TFIIIA de plantas compartían una identidad de secuencia alta (Figura 5. C), lo que sugiere una función conservada en la regulación de la transcripción de genes de ARN 5S.

De los 98 genes *VviZFP*, 54 no poseen intrones (55%) mientras que 14 (~ 15%) poseen 1 intrón, 14 poseen 2 intrones, 5 (5%) poseen 3 intrones y el resto (25%) poseen 5 o más intrones (Figuras 6 y 7). Las longitudes de los genes revelaron variaciones entre ellos. El gen *VviZFP* más corto fue de 226 pb (*VviZFP16*), mientras que el más largo fue *VviZFP70* (23,692 pb).

1.3.3 Los dominios conservados en las *VviZFP* son consistentes con su papel en la regulación de la expresión génica

La caracterización detallada de los dominios proteicos conservados entre las *VviZFP* se realizó sobre la base de los árboles filogenéticos generados. Dentro del set A (Figura 6. C), las proteínas del grupo I conservan un tamaño de proteína similar y la posición del arreglo de dominios C2H2-ZF permanece cerca de la región N-terminal. En los otros grupos (II a IV), la longitud de las proteínas, la posición de los arreglos de dominios C2H2-ZF y la presencia de otros dominios proteicos varían considerablemente. Por su parte, los miembros del set C (Figura 7. C) varían en la longitud de proteína, el número y posición de los dominios C2H2-ZF. Los grupos III y IV se caracterizan por poseer proteínas con un solo dominio C2H2-ZF (excepto *VviZFP87*, *VviZFP44* y *VviZFP23*) y un número variado de motivos EAR en diferentes posiciones.

El análisis de secuencias revela que las *VviZFPs* comparten algunos motivos proteicos con proteínas cuyo rol en el desarrollo reproductivo ha sido previamente reportados (Figura 6C y Figura 7C). En el grupo de proteínas del set A, *VviZFP70* y *VviZFP88* poseen los dominios Jumanji (JmjC y JmjN) además de un arreglo de cuatro dominios C2H2-ZF (sin motivo QALGGH). En *Arabidopsis*, algunas proteínas demetilinasas de histonas que contienen el dominio Jumanji median la desrepresión temporal y espacial de genes necesarios para una amplia gama de procesos en plantas como la señalización hormonal, el control del reloj circadiano y el proceso de floración [106-108]. Dos de estas proteínas, ELF6 y REF6, están implicadas en la regulación del tiempo de floración mediante modificaciones de histonas [106,108,109] y corresponden a proteínas nucleares con los mismos dominios (C2H2-ZF y Jumanji) como *VviZFP70* y *VviZFP88*. El análisis filogenético (Figura 8) indica una cercanía de *VviZFP70* con las proteínas ELF6 de plantas leñosas y, en menor grado, con ELF6 y REF6 de *Arabidopsis*. *VviZFP88* forma otro clado con la proteína REF6 putativa de *Vitis riparia* Michx. y está más distanciado filogenéticamente de las proteínas de *Arabidopsis*. Este análisis sugiere a *VviZFP70* como un posible remodelador de cromatina regulando el tiempo de floración en la vid, o incluso regulando otros procesos en esta especie. Además, los genes *VviZFP45* y *VviZFP77* codifican para proteínas con el dominio EXOIII y tres o dos dominios C2H2-ZF en tándem, respectivamente. Ambas proteínas podrían pertenecer a la familia EXOIII, una de las dos familias de endonucleasasapurínica/apirimidinica (AP) implicadas en el mecanismo de reparación del ADN [110].

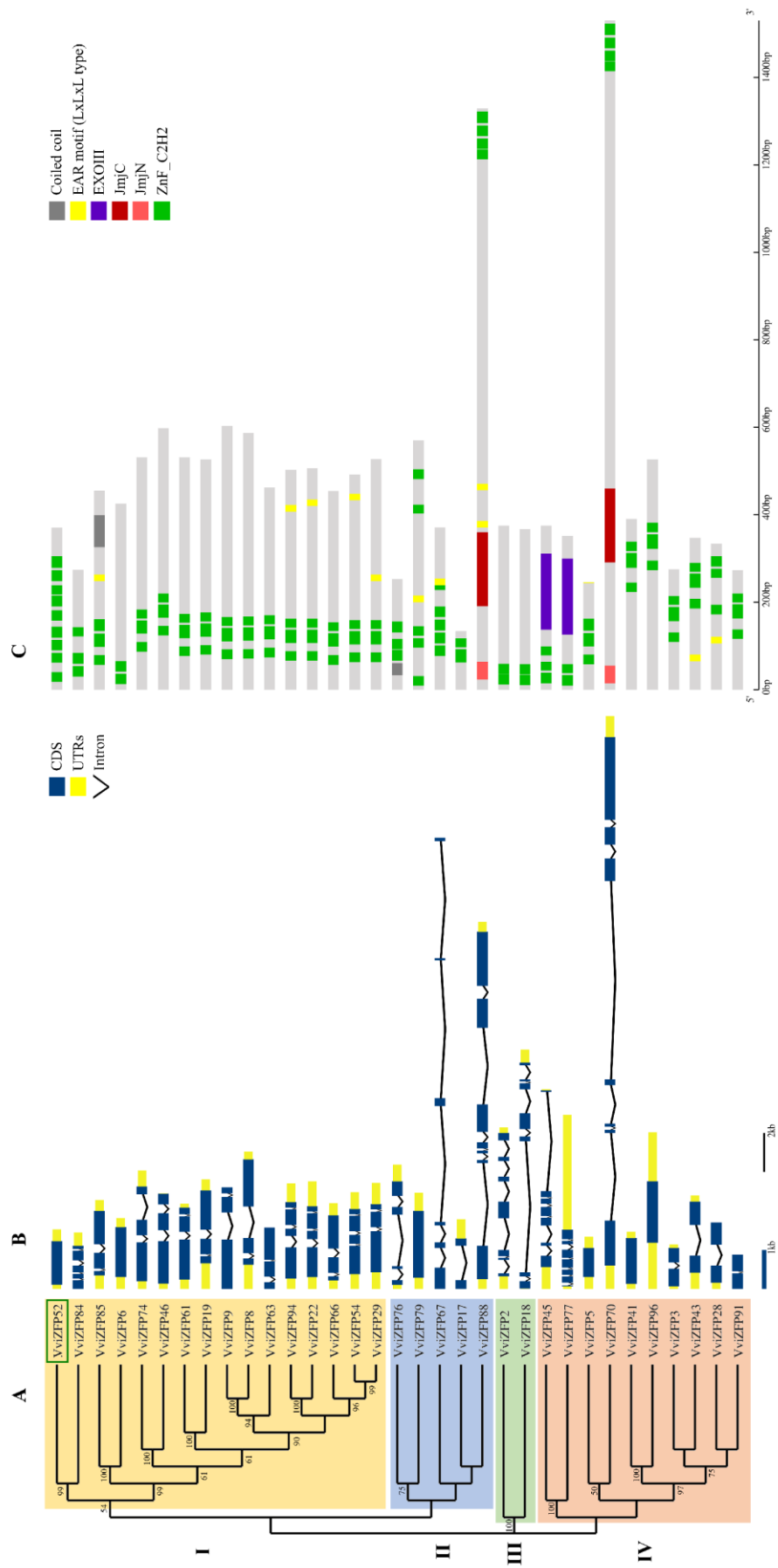


Figura 6 (Página anterior). Vista analítica del set A de la familia *VviZFP*. (A) Árbol filogenético sin raíz construido por el método NJ utilizando alineamientos de secuencias de aminoácidos de longitud completa. No se muestran los valores de *bootstrap* inferiores a 50. (B) Diagramas esquemáticos de las estructuras intrón/exón de los genes *VviZFP* en el genoma de la vid. Los recuadros azules indican los exones, las líneas indican los intrones y las regiones no traducidas (*untranslated region, UTR*) se muestran mediante recuadros amarillos. (C) Representación esquemática de los motivos conservados en las *VviZFP*. Los recuadros verdes representan dominios C2H2-ZF y los recuadros de colores indican otros dominios conservados identificados. Los modelos genéticos y la longitud de los motivos y proteínas se pueden estimar utilizando la escala de la parte inferior. Los diferentes grupos están resaltados con colores. En el recuadro verde *VviZFP52* es el único gen del set B. Motivo EAR, motivo de represión anfifílica asociada a elementos de respuesta a Etileno (EAR-motif); EXOIII, Exonucleasa RNAsa T/ ADN polimerasa III (IPR013520); JmjC, Jumonji C (IPR003347); JmjN, Jumonji N (IPR003349)

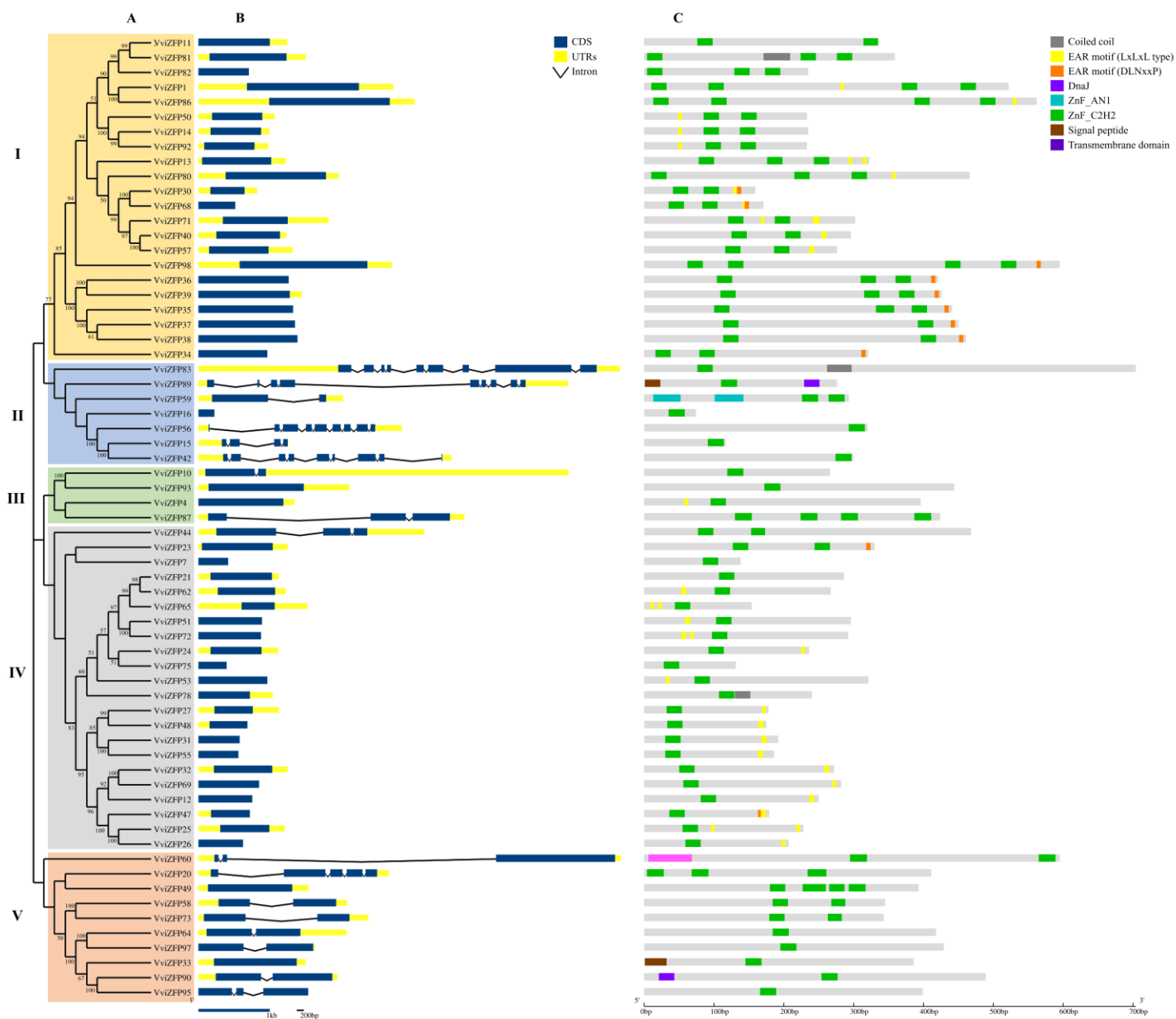


Figura 7. Vista analítica del set C de la familia VviZFP. (A) Árbol filogenético sin raíz construido por el método NJ utilizando alineamientos de secuencias de aminoácidos de longitud completa. No se muestran los valores de *bootstrap* inferiores a 50. (B) Diagrama esquemático de las estructuras intrón/exón de los genes *VviZFP* en el genoma de la vid. Los recuadros azules indican los exones, las líneas indican los intrones y las UTR se muestran mediante recuadros amarillos. (C) Representación esquemática de los motivos conservados en las VviZFP. Los recuadros verdes representan dominios C2H2-ZF y los recuadros de colores indican otros dominios conservados identificados. Los modelos genéticos y la longitud de los motivos y proteínas se pueden estimar utilizando la escala de la parte inferior. Los diferentes grupos están resaltados con colores. Motivo EAR, motivo de represión anfifílica asociada a elementos de respuesta a Etileno (EAR-motif).

Posteriormente, se identificaron dominios y motivos proteicos previamente reportados en C2H2-ZFP relacionadas con el desarrollo del polen, buscando posibles candidatos específicos de la vid. De acuerdo a literatura reportada hasta la fecha, las C2H2-ZFPs relacionadas al desarrollo del polen pueden poseer una NLS, motivos EAR y un número variable de dominios C2H2-ZF [72,77,111,112]. Los resultados del análisis en cNLS Mapper indicaron que la importación nuclear de 40 VviZFPs (17 en el set A, 1 en el set B y 22 en el set C) podría estar mediada por su NLS. Además, se identificó un motivo EAR en 49 VviZFPs (50% de total) (Figura 9). La mayoría de estas proteínas corresponden al set C (39 proteínas) y una cantidad menor (10 proteínas) se agrupan en el set A (Figura 9. A). Predominantemente, la familia VviZFP posee un motivo EAR en la región C-terminal de la proteína (Figura 9. C, D). Aproximadamente el 82% de estas proteínas contienen un motivo EAR de tipo LxLxL, el 15% contiene un motivo EAR de tipo DLNxxP y el 3% restante posee un motivo en el que los motivos EAR de tipo LxLxL y DLNxxP se superponen (Figura 9. E).

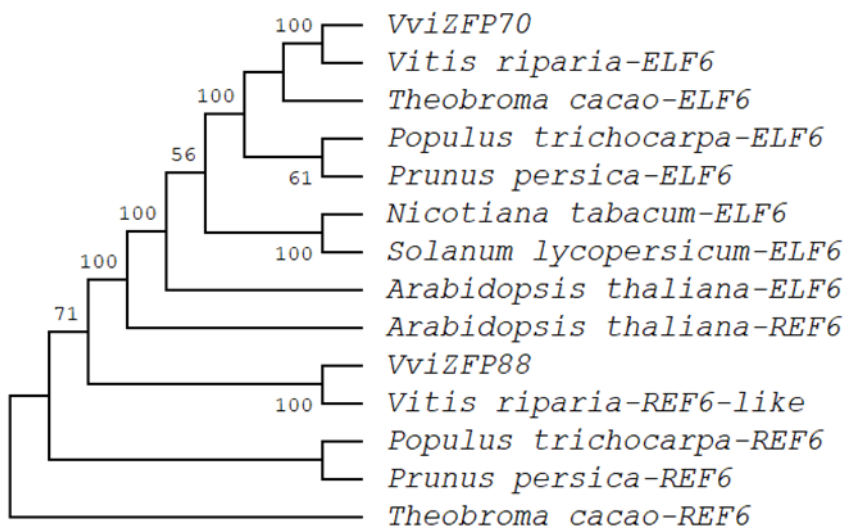


Figura 8. Árbol filogenético de las proteínas ELF6 y REF6 de plantas, incluyendo los supuestos ortólogos de la vid. Árbol filogenético sin raíz construido por el método NJ utilizando alineamientos de secuencias de aminoácidos de longitud completa. No se muestran los valores de *bootstrap* inferiores a 50.

1.3.4 Evolución de la familia de genes VviZFP

Los genes *VviZFP* se distribuyen a lo largo de los diecinueve cromosomas de la vid (Figura 10, Tabla 1). El cromosoma 6 presentó una mayor frecuencia de estos con 16 genes *VviZFP* (0.7 genes por Mb), mientras que los cromosomas 10 y 11 contienen solo un gen *VviZFP* (0.04 y 0.05 genes por Mb, respectivamente). La distribución promedio de los genes *VviZFP* por Mb en el genoma de la vid fue de 0.2.

La amplia distribución que presenta esta familia de genes podría explicarse en parte por la duplicación génica generada por eventos de duplicación segmental (intracromosómica e intercromosómica) durante la evolución molecular. En esta línea, se identificó que 24 genes *VviZFP* se encuentran conformando nueve grupos derivados de eventos de duplicación intracromosómica (Figura 11). Estos eventos se distribuyen en el cromosoma 1 (un grupo), 3 (un grupo), 5 (un grupo), 6 (tres grupos), 7 (un grupo), 15 (un grupo) y 17 (un grupo). El grupo ubicado en el cromosoma 1 está compuesto por *VviZFP8* y *VviZFP9* y presentan un alto porcentaje de identidad entre ellos (67,6%).

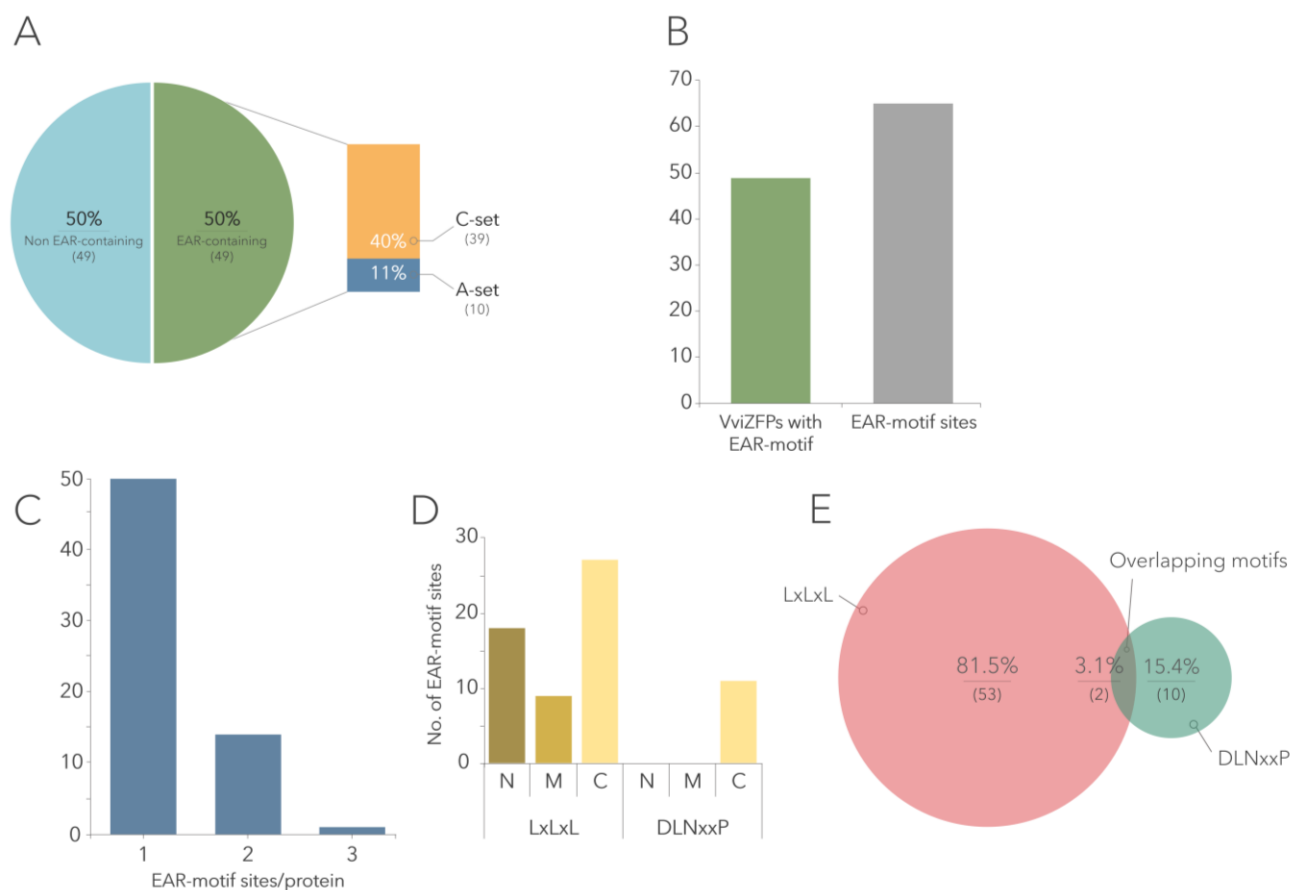


Figura 9. Descripción general del repesoma-EAR de la familia *VviZFP*. (A) Proporción y clasificación de secuencias que contienen motivos EAR dentro de la familia *VviZFP*. (B) Número total de *VviZFP* que contienen motivos EAR, e incidencia motivos EAR dentro de esta familia de proteínas. (C) Distribución de sitios con motivo EAR en las *VviZFP*. (D): Frecuencia de los sitios con motivo EAR en la región N-terminal, C-terminal o región media de las *VviZFP* (C, C-terminal; M, medio; N, N-terminal). (E): Incidencia de tipos de motivos EAR en las *VviZFP*.

Estos genes están agrupados en el árbol filogenético (en el grupo IV de set C), lo que sugiere un ancestro común más reciente entre estos dos *VviZFP*. Asimismo, en el grupo identificado en el cromosoma 5, se observa una alta similitud entre *VviZFP25* y *VviZFP26* (74,9%) y a su vez una baja similitud entre estos y *VviZFP27* (Figura 11). El alineamiento global de estas secuencias indicó que el dominio C2H2-ZF y el motivo EAR se conservan entre estos miembros. Los tres genes integran el grupo IV del árbol filogenético (Figura 7), compartiendo la estructura génica y la disposición de los motivos proteicos. Esto sugiere que *VviZFP25*, *VviZFP26* y *VviZFP27* provienen de eventos de duplicación probablemente en diferentes momentos de la historia evolutiva de la especie, siendo más reciente la generación de *VviZFP25* y *VviZFP26* a partir de un ancestro común.

Por otro lado, la alta frecuencia de genes *VviZFP* en el cromosoma 6 representa una fuente para la innovación genética en el genoma de la vid. El primer grupo del cromosoma 6 está compuesto por *VviZFP31* y *VviZFP32*. Ambas proteínas comparten un bajo porcentaje de identidad (33,1%) y la alineación global indica que solo el dominio C2H2-ZF y el motivo EAR se conservan entre ambas proteínas. El análisis filogenético sugiere un ancestro común cercano ya que ambos genes se agrupan en el grupo IV del set C. El grupo más grande identificado se encuentra también en el cromosoma 6 y está compuesto por los genes *VviZFP34*, *VviZFP35*, *VviZFP36*, *VviZFP37*, *VviZFP38* y *VviZFP39*. Estos genes, con la excepción de *VviZFP34*, están agrupados de cerca en un clado dentro del grupo I del set C (Figura 7. A). En el clado, como en todo el grupo, se conserva la estructura sin intrones (Figura 7. B). La similitud de secuencia sugiere que este grupo pudo ser formado por eventos de duplicación intracromosómica. El resto de los grupos muestran una baja identidad de secuencia entre pares, pero en los análisis filogenéticos se observan agrupados (a excepción del grupo formado por los genes *VviZFP40* y *VviZFP41*), lo que sugiere que provienen de un ancestro común y que divergieron en el pasado. Los eventos de duplicación inter cromosómica son otro componente que podría explicar en parte la distribución y diversidad de la familia *VviZFP*. El análisis de duplicación de genes identificó 41 parálogos además de los 98 ya mencionados. En resumen, 57 genes *VviZFP* no presentaron parálogos en el genoma de la vid; 20 presentaron un parálogo; 16 se pueden encontrar en duplicado; 3 se pueden encontrar en triplicado; *VviZFP30* y *VviZFP94* presentaron cuatro y cinco parálogos respectivamente en diferentes cromosomas (Figura 12). Estas relaciones se pueden visualizar en el diagrama de Circos (*Circos-plot*) (Figura 13).

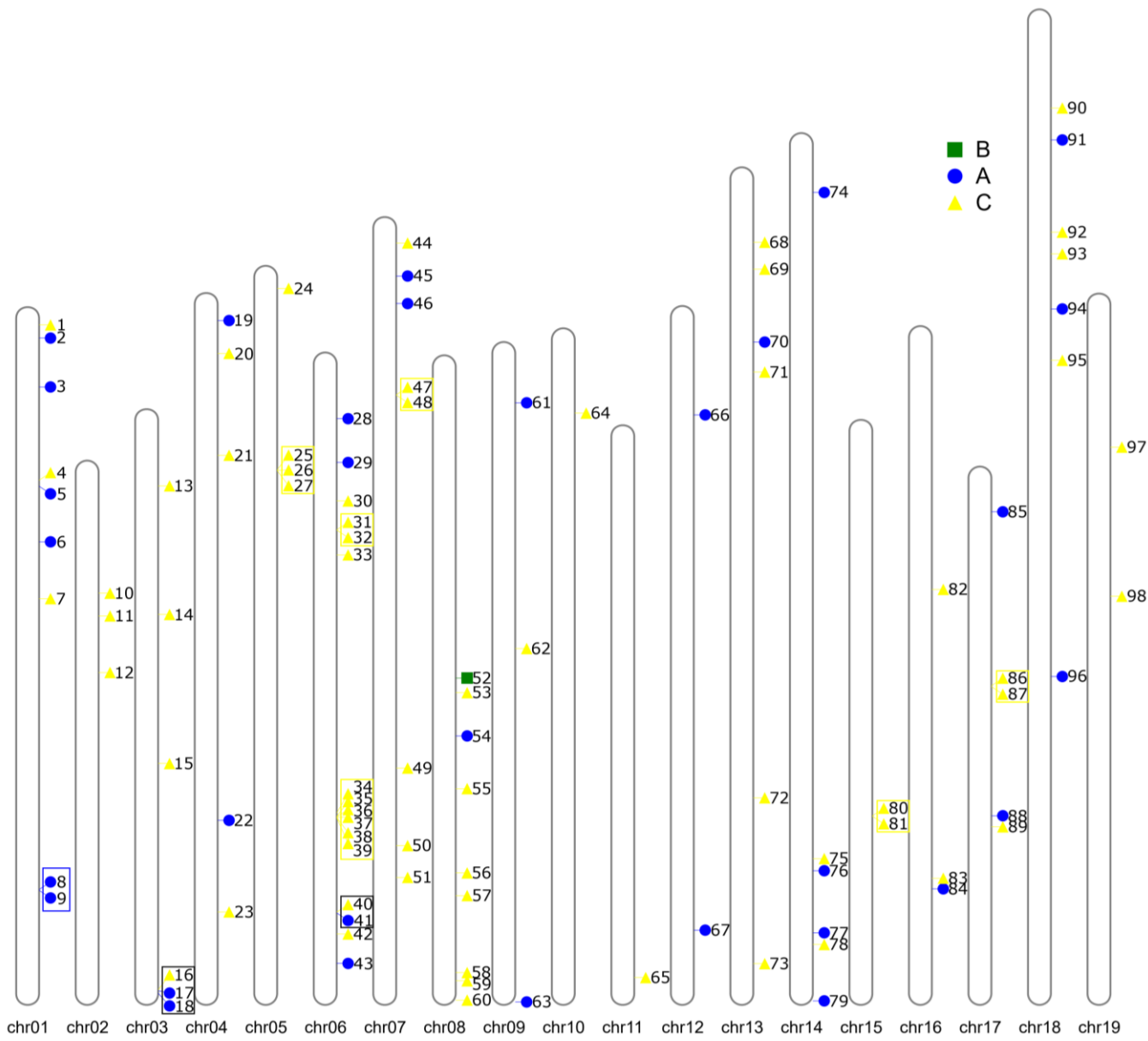


Figura 10. Ideograma de la distribución genómica y duplicaciones en tándem de genes *VviZFP* en los 19 cromosomas de la vid. El número de cromosomas se indica en la base de cada cromosoma. Cada número indica el nombre del *VviZFP* y el símbolo muestra la posición en los cromosomas. Los símbolos azul, verde y amarillo corresponden a los genes *VviZFP* del set A, B y C, respectivamente. Los genes repetidos en tándem se indican en un cuadro negro.

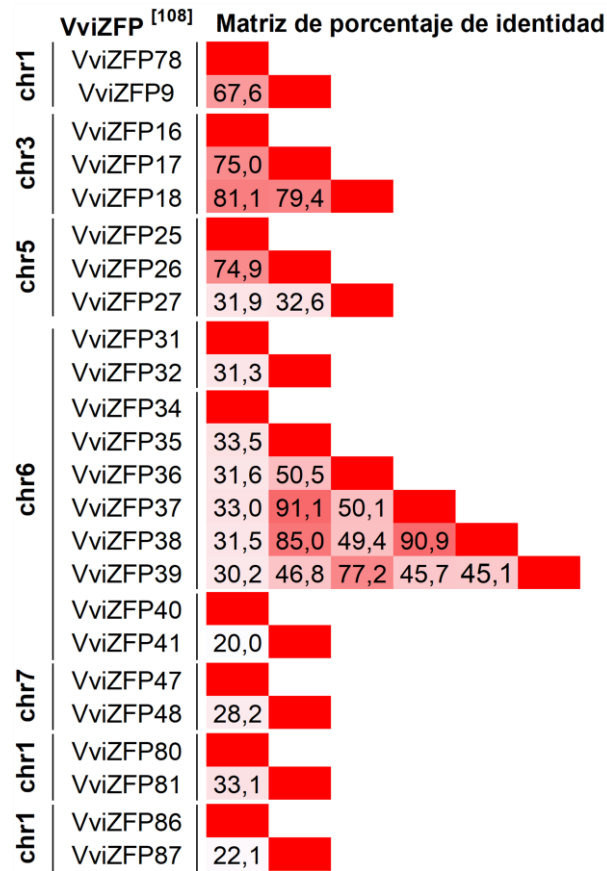


Figura 11. Eventos de duplicación en tándem en cromosomas de vid. El porcentaje de identidad se obtuvo desde el alineamiento global de pares de secuencias utilizando el software Clustal Omega [85]. La intensidad del rojo de la celda indica el grado de similitud entre secuencias. Las celdas rojas corresponden a un 100% de identidad de secuencia.

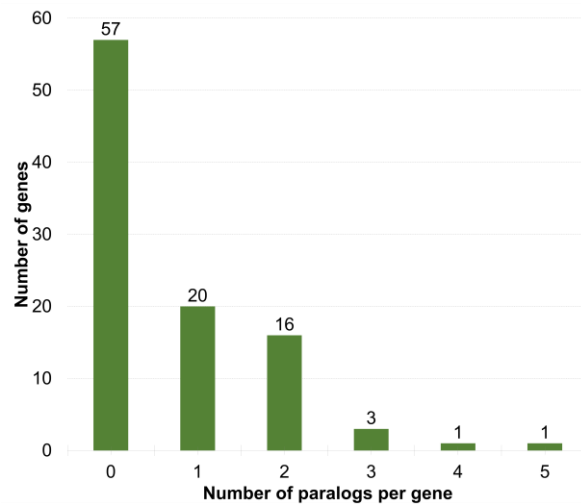


Figura 12. Histograma indicando el número de parálogos identificados desde los 98 genes *VviZFP* analizados.

Luego, se analizaron las proporciones de sustitución no sinónima (d_N) versus sinónima (d_S) (proporción d_N/d_S), para comprender aún más qué proceso de selección impulsó la evolución de la familia de genes *VviZFP*. Una relación d_N/d_S mayor que 1 se interpreta como una selección positiva entre los parálogos. Una proporción cercana a 1 significa una selección neutra y una proporción menor a 1 se interpreta como selección negativa, o selección purificadora entre los parálogos. La relación d_N/d_S para todos los parálogos evaluados fue inferior a 1. Esto sugiere que las secuencias de parálogos, con respecto a sus genes de referencia, han estado bajo selección negativa o purificadora. Por tanto, a lo largo del tiempo, los parálogos se han ido seleccionando para traducirse en casi la misma secuencia de proteínas con respecto al gen de referencia conocido. Una explicación alternativa más simple es que gran parte de estas duplicaciones son recientes en la historia evolutiva de la vid. Esto indica una selección purificadora, es decir, que la proteína traducida del gen original se ha mantenido en las secuencias parálogas (en el caso de que los parálogos se expresen y traduzcan). En la Figura Suplementaria 2 se presenta un gráfico de barras de las relaciones d_N/d_S para cada par de genes parálogos.

Además, se realizó un análisis de enriquecimiento de GO para inferir respecto al proceso biológico (BP), la función molecular (MF) y el componente celular (CC) de los genes *VviZFP* (Tabla Suplementaria 1, Figura 14). La mayoría de los términos enriquecidos al nivel BP están relacionados con la regulación de los procesos de crecimiento y desarrollo. En el nivel de MF, los términos enriquecidos incluyeron unión de iones cinc, unión de ácido nucleico, unión de ADN, actividad de homodimerización de proteínas, actividad de dimerización de proteínas y actividad de factor de transcripción. Los términos más enriquecidos en CC fueron el núcleo y el orgánulo intracelular, lo que concuerda con los resultados de nuestro análisis de cNLS Mapper.

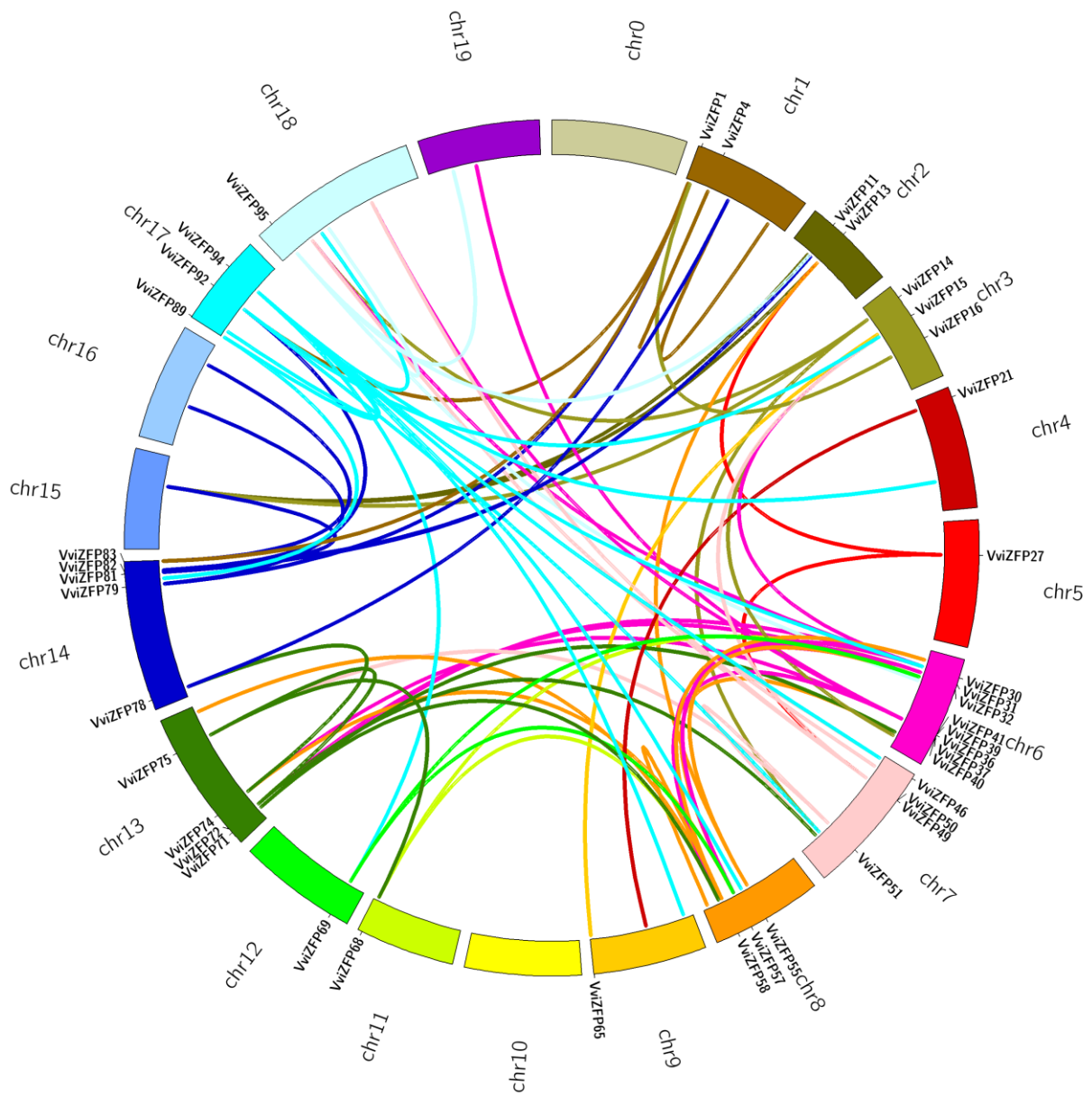


Figura 13. *Circos-plot* de 41 genes *VviZFP* y sus parálogos a lo largo del genoma de la vid (ensamble versión 12X.V2). El genoma es representado a través de sus cromosomas como segmentos de una circunferencia. Los nombres y posiciones de los 41 genes *VviZFP* y sus parálogos están indicados en la circunferencia y conectados a través de líneas. Líneas del mismo color conectando dos posiciones en el genoma representan regiones parálogas.

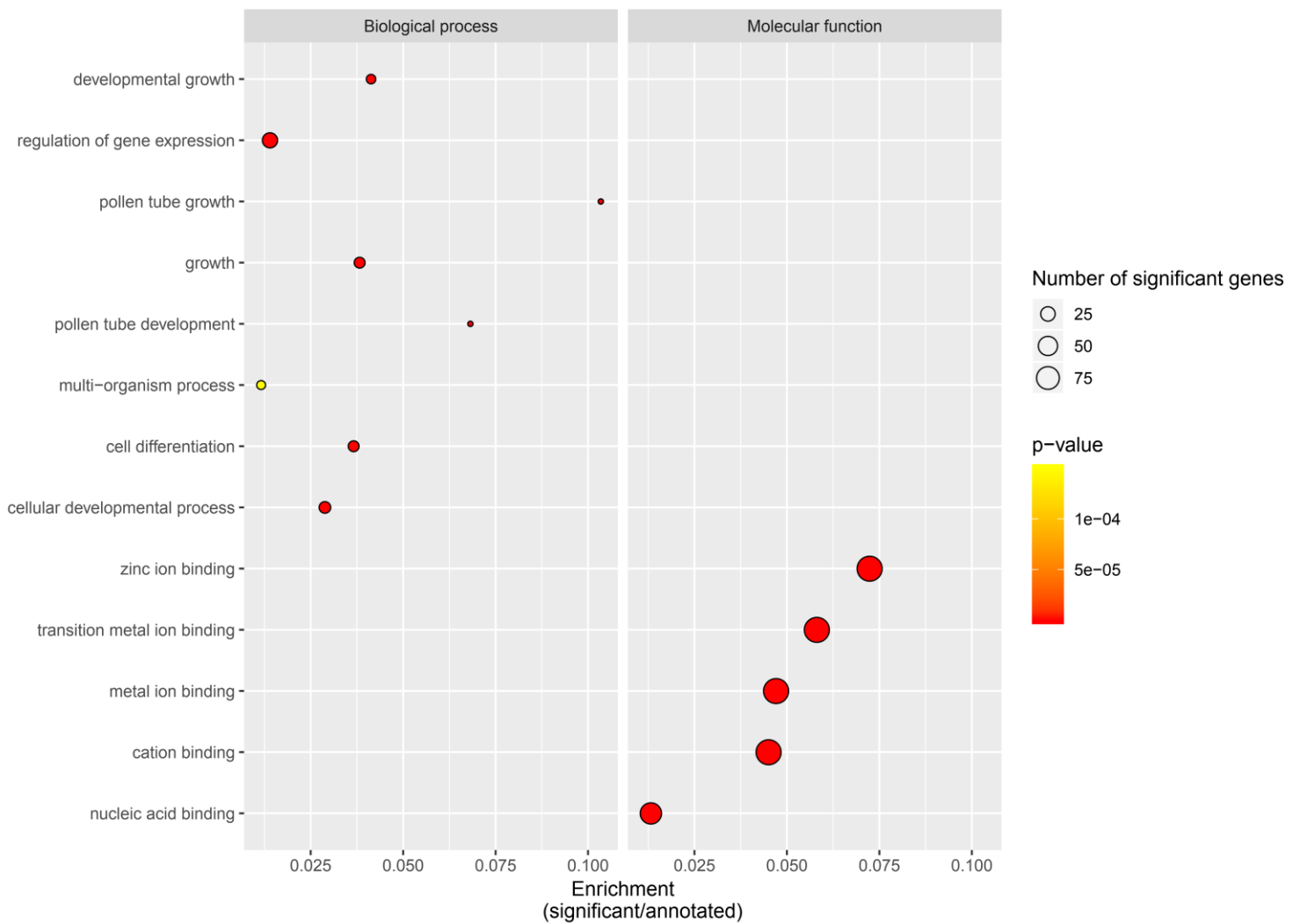


Figura 14. Análisis de enriquecimiento de términos de Ontología Génica en la familia *VviZFP*. El eje X indica el valor de enriquecimiento, calculado como el número de genes *VviZFP* en una categoría GO dada dividido por el número total de genes en la categoría. El tamaño de los puntos indica el número absoluto de genes *VviZFP* en la categoría GO dada. El color indica el *p-value* ajustado. Basado en [113].

1.3.5 El análisis de expresión génica *in-silico* permite identificar genes *VviZFP* candidatos a evaluar en el desarrollo de anteras y polen

Para visualizar el perfil de transcripción global de la familia de genes *VviZFP*, se realizó un mapa de calor basado en datos de microarreglos del atlas de expresión de la vid (Figura 15); 13 de los 98 genes no se encontraron en la base de datos debido a las diferencias entre las versiones de ensamblaje del genoma utilizadas (Genoscope 12X.v0 en el atlas de expresión de la vid y URGI 12X.v2 utilizada en este trabajo).

En términos generales, algunos genes *VviZFP* presentaron un perfil de expresión similar en los diferentes órganos/tejidos evaluados, mientras que otros *VviZFP* exhiben una especificidad de expresión en órganos/tejidos. Esto sugiere una posible divergencia funcional de los genes *VviZFP* durante el desarrollo de la vid. Por ejemplo, seis *VviZFP* (*VviZFP26*, *VviZFP47*, *VviZFP32*, *VviZFP69*, *VviZFP3* y *VviZFP31*) se expresan a un nivel bajo en todos los tejidos analizados, mientras que *VviZFP22*, *VviZFP15* y *VviZFP42* se expresan de forma ubicua en casi todos los tejidos analizados. Algunos *VviZFP* mostraron un nivel muy alto en órganos/tejidos específicos. Por ejemplo, *VviZFP46* y *VviZFP91* mostraron un nivel de expresión más alto en semilla que otros órganos, lo que sugiere que podrían estar involucrados en el desarrollo de la semilla. *VviZFP24* presentó un nivel de expresión relativamente alto en zarcillos jóvenes y bien desarrollados, lo que indica una posible participación de este gen en el desarrollo de zarcillos.

Luego, para dar una idea de los patrones de expresión temporal de los genes *VviZFP* durante el desarrollo floral de la vid, nos enfocamos en seis muestras: Flor joven (Y, E-L14), Flor bien desarrollada (W, E-L17), Inicio de la floración (SF, E-L20), Floración (F, E-L23) estambre (S) y polen (P). La información generada en el análisis de expresión génica sirve como base preliminar para generar hipótesis posteriores. A partir del mapa de calor (Figura 16. A), se pueden identificar patrones de expresión contrastantes, comparando el desarrollo floral con la expresión específica de estambres y polen. A modo de ejemplo, *VviZFP26*, *VviZFP53*, *VviZFP39*, *VviZFP47*, *VviZFP3*, *VviZFP31*, *VviZFP32* y *VviZFP69* presentan bajos niveles de expresión en todas las muestras evaluadas, lo que sugiere que estos genes no participan en el desarrollo de la flor; por el contrario, los genes *VviZFP18* y *VviZFP96* presentan altos niveles de expresión en todas las muestras del análisis. *VviZFP13* se expresa fuertemente en polen y, en menor medida, de manera creciente en flores durante el desarrollo, lo que podría indicar que este gen participa en el desarrollo del gametofito masculino.

El análisis de expresión de estas etapas mediante agrupación jerárquica y de k-medias ($k = 3$) identificó dos patrones contrastantes: El primer grupo (39 genes) presentó una tendencia a reducir su expresión a través del desarrollo floral, mientras que el segundo grupo (25 genes) mostró la tendencia contraria (Figura 16. C). El tercer patrón contiene 20 genes y no fue posible determinar un patrón de expresión distinguible. Esta agrupación nos permite proponer, a partir de la dinámica de expresión ascendente y descendente a lo largo del desarrollo floral, que dentro de los dos primeros grupos se podrían encontrar los genes *VviZFP* que participan en el desarrollo del polen. Dentro de ambos grupos de expresión,

mediante alineamiento local básico (BLAST) se identificó un grupo de genes *VviZFP* que comparten alguna similitud de secuencia con varias C2H2 ZFP previamente reportadas y vinculadas al desarrollo de polen en *Arabidopsis* y otras especies. Es así como a partir de una identificación y caracterización masiva de genes a nivel de genoma completo se llegó a un grupo reducido de genes candidatos (Tabla 2), interesantes de estudiar en el contexto del desarrollo del polen en la vid.

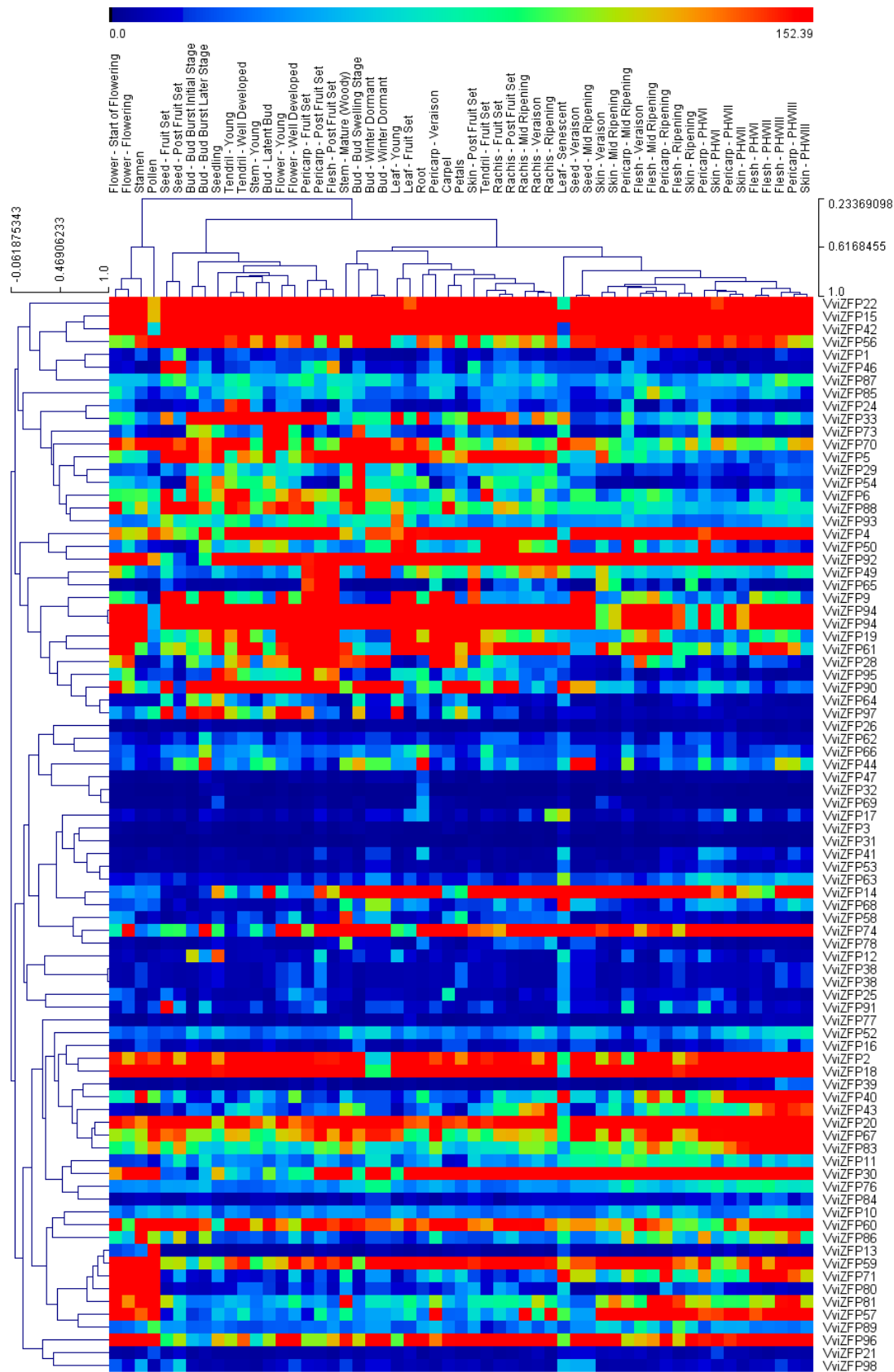


Figura 15 (Página anterior). Atlas de expresión de la familia de genes *VviZFP* en la vid. Cluster jerárquico de los perfiles de expresión de 79 genes *VviZFP* en 54 muestras que cubren diferentes tejidos y etapas del desarrollo vegetativo, floral y frutal.

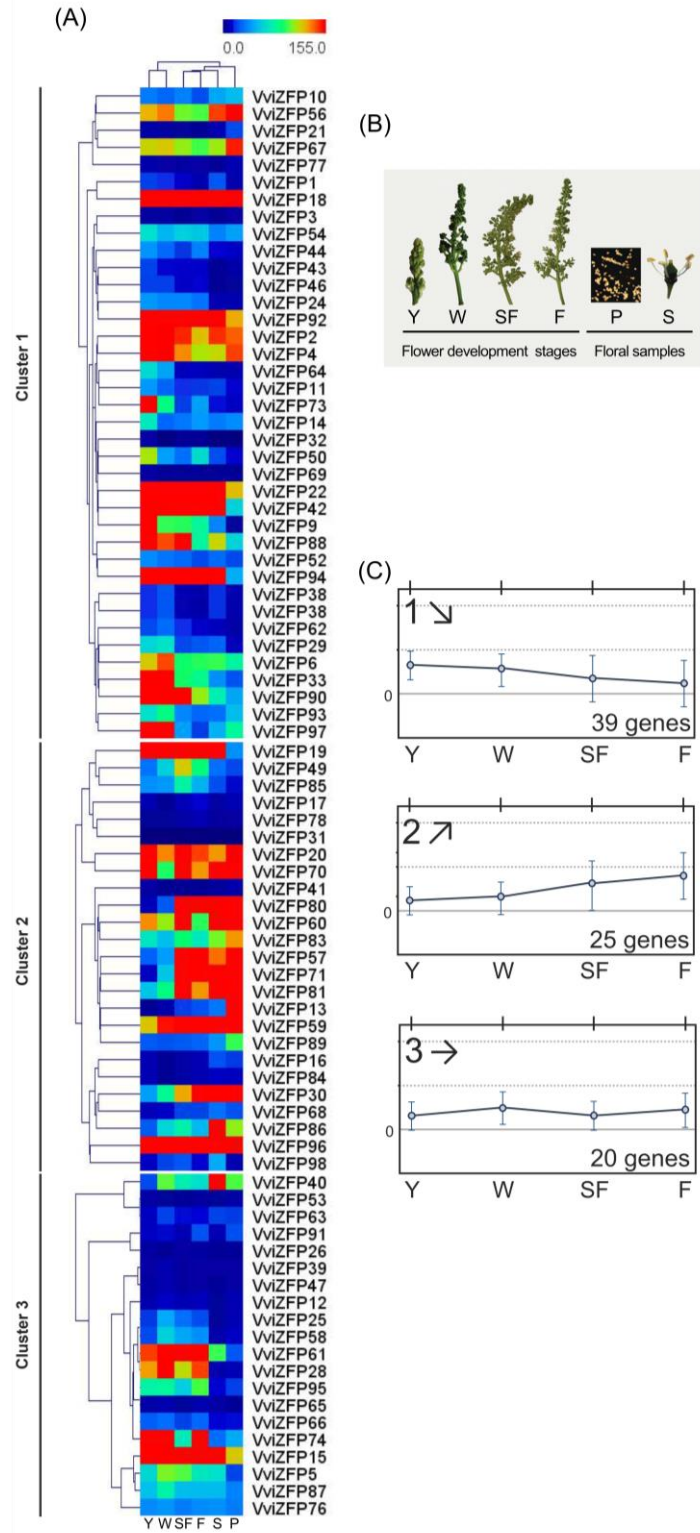


Figura 16 (Página anterior). Expresión diferencial de los genes *VviZFP* durante el desarrollo floral. (A) Agrupamiento jerárquico y mapa de calor de los perfiles de expresión de 85 genes *VviZFP* cubriendo el desarrollo floral y tejidos florales. (B) Detalle de las muestras utilizadas en el análisis. Las etapas del desarrollo están abreviadas de acuerdo a [101]. (C) gráficos de centroides de la expresión de genes *VviZFP* agrupados. Los patrones identificados mostraron (1) expresión decreciente y (2) ascendente a lo largo del desarrollo floral. El grupo (3) no presentó un patrón de expresión distinguible. Se indica el número de genes en cada grupo.

Tabla 2. Genes *VviZFP* candidatos seleccionados y su putativo ortólogo en plantas modelo. PBC, polen bicelular.

VviZFP	% de identidad	Ortólogo	Especie	Expresión	Función	Ref.
<i>VviZFP30</i>	62.18	<i>PEThy;ZPT2-5 (MEZ1)</i>	<i>petunia</i>	Polen	Meiosis	[114]
<i>VviZFP68</i>	58.43					
<i>VviZFP81</i>	54.05	<i>PEThy;ZPT3-3</i>	<i>petunia</i>	Pistilo y tejido de transmisión	No definido	[112]
<i>VviZFP1</i>	44.44	<i>PEThy;ZPT4-2</i>	<i>petunia</i>	Estambre	No definido	[68]
<i>VviZFP1</i>	44.09	<i>PEThy;ZPT4-3</i>	<i>petunia</i>	Estambre	No definido	[68]
<i>VviZFP1</i>	42.02	<i>BcMF20</i>	<i>B. campestris</i>	Polen y tapetum	Desarrollo del polen	[111]
<i>VviZFP80</i>	62.16	<i>PEThy;ZPT4-1</i>	<i>petunia</i>	etapas finales del desarrollo del polen (PBC)	No definido	[68]
<i>VviZFP40</i>	40.83	<i>PEThy;ZPT2-6</i>	<i>petunia</i>	Desde PBC hasta la dehiscencia de anteras	No definido	[68]
<i>VviZFP13</i>	49.62	<i>AtDAZ1</i>	<i>arabidopsis</i>	Nuclear y citoplasmática en células germinales	División de células germinales	[77]
<i>VviZFP13</i>	57.04	<i>AtDAZ2</i>	<i>arabidopsis</i>	Nuclear en células germinales	División de células germinales	[77]
<i>VviZFP85</i>	56.64	<i>SGR5/IDD15</i>	<i>arabidopsis</i>	Cortex, endodermis tejido vascular en brote floral	regula la biosíntesis y el transporte de auxinas (en vía de gravitropismo)	[115]

1.4 DISCUSIÓN

En las plantas, la familia de genes *C2H2 ZFP* codifica para el grupo más grande de proteínas reguladoras y se conocen varios miembros que juegan un papel importante en los procesos de crecimiento y desarrollo [114,116,117], transducción de señales hormonales [118] y respuesta al estrés [119,120]. El desarrollo de la tecnología de secuenciación de alto rendimiento y la capacidad de analizar genomas completos ha permitido el análisis de la familia *C2H2-ZFP* de varias especies. La identificación y caracterización de genoma amplio de esta familia se ha llevado a cabo en *arabidopsis* [61], arroz [121], álamo (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray ex Hooker), [62,122], mijo (*Setaria italica* (L.) P.Beauv). [123], maíz (*Zea mays* L.) [124],

tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) [125], soya [126], *Brassica rapa* L. [127] y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) [128,129], pero a la fecha, este análisis no se ha llevado a cabo en la vid.

En el mijo, el 78% de las C2H2-ZFP poseen dominios ZF con motivos QALGGH, los que se denominan como tipo Q [123]. Esta familia de genes en soya se clasifica en 11 subconjuntos distinguibles sobre la base de arreglos, números y tipos de dominios C2H2-ZF. Los análisis filogenéticos y de GO realizados en esta especie, confirman la racionalidad de la clasificación [126]. La familia C2H2-ZFP reportada para el genoma de maíz, se divide en tres subgrupos (A, B y C), de igual manera como se clasifican en arábidoopsis [124].

En este capítulo, se reporta la identificación de 98 genes *C2H2-ZFP* en el genoma de la vid, estas codifican para proteínas con al menos un dominio C2H2-ZF conservado. Este número es mayor que la lista de 64 genes alojada en la *Plant transcription factors database v4.0* [130], lo que puede atribuirse a la identificación de nuevas variantes de genes *C2H2 ZFP* en el genoma de la vid. El tamaño de esta familia génica en la vid es menor, si se compara con lo reportado para arábidoopsis (176 genes), arroz (189 genes), álamo (109 genes), mijo (124 genes), maíz (211 genes), tabaco (188 genes), soya (321 genes) y *B. rapa* (301 genes); por otro lado, la familia *VviZFP* posee un tamaño significativamente mayor comparado con lo reportado en algodón (29 genes) por [128] pero menor a lo reportado para la misma especie (386 genes) por [129].

1.4.1 Comprendiendo la evolución y expansión de la familia de genes *VviZFP*

Se sabe que, durante la evolución del genoma vegetal y animal, se produjeron eventos de duplicación segmentaria (*segmental duplication*, SD) y duplicación de genoma completo que condujeron a un aumento de la complejidad biológica y al origen de novedades evolutivas [131,132]. A lo largo de la historia evolutiva de la vid han ocurrido cambios significativos en su genoma, que incluyen eventos de duplicación en tándem y segmentaria [133]. La primera caracterización del genoma de la línea de vid cultivar 'Pinot Noir' altamente homocigótica PN40024 reveló que contiene tres genomas ancestrales que constituyen el contenido diploide de la vid, siendo descrito por Jaillon [133] como un organismo "paleo-hexaploide". Velasco [134] propuso una explicación alternativa para el alto número de regiones triplicadas en el genoma de la vid, proponiendo que en el linaje *Vitis*, ocurrió un evento de duplicación a gran escala (probablemente un evento de hibridación), antes de la divergencia entre *Vitis* y otras dicotiledóneas. Además, las SD muy similares constituyen moldes en los cromosomas para eventos de recombinación homóloga no alélica (*Non-allelic homologous recombination*, NAHR) [135]. Las NAHR son una forma de recombinación homóloga que se produce entre dos regiones del ADN que tienen una gran similitud de secuencia, pero no son alelos. El emparejamiento erróneo entre dos regiones no alélicas puede conducir, después de la recombinación, a reordenamientos por inversión, duplicación, delección o translocación [136]. Se han publicado estudios sobre el papel de la SD en la evolución de los genomas de la vid y otras plantas y su contribución a la expansión de familias de genes [135-137], revelando el gran impacto de las SD en la evolución de genes relacionados con la resistencia a enfermedades, el desarrollo

de las bayas y la proceso de maduración [135]. Estos cambios, pudieron haber contribuido a la expansión de la familia de genes *VviZFP* y a la heterogeneidad observada en términos de longitud de genes y organización intrón-exón, dando cuenta de la compleja historia evolutiva descrita para esta especie. Luego de los eventos de duplicación, los genes recién formados se enfrentan a una elección de varios destinos en relación con sus funciones [138]. Inicialmente, los genes duplicados tienen secuencias y funciones idénticas, pero conforme la especie evoluciona, tienden a la divergencia en las regiones reguladoras (región promotora) y codificantes. Variaciones en las regiones reguladoras puede dar lugar a cambios en los patrones de expresión, mientras que los cambios en la región codificante pueden conducir a la adquisición de nuevas funciones [139]. Es interesante constatar que muchos de los eventos de duplicación génica (duplicación en tándem y segmentaria) identificados para la familia *VviZFP* se encuentran en regiones colineales del genoma angiosperma ancestral [133]. Estos resultados son consistentes con la distribución genómica producto de duplicaciones génicas de genes C2H2-ZFP en otras plantas modelo.

1.4.2 Los dominios y motivos proteicos identificados, además de los C2H2-ZF, podrían ser importantes en la función biológica de las *VviZFP*

La comparación de secuencias de las *VviZFPs* reveló que casi la mitad de las proteínas podrían estar involucradas en reprimir la transcripción del ADN a través del motivo EAR (Figura 9). Este motivo proteico está altamente conservado en plantas y ha sido detectado en el 10-25% de los factores de transcripción integrando múltiples familias de genes [72]. En plantas, la familia de proteínas TOPLESS/TOPLESS RELATED (TPL/TPR) median la actividad represora de diferentes factores de transcripción que contienen motivo EAR, al actuar sobre la cromatina a través de histona deacetilasas [72,140]. Además de las C2H2-ZFP, el motivo EAR es conocido en proteínas tipo ERF, MYB, HOMEBOX, MADS y NAC [72] por su función como regulador negativo en una amplia gama de procesos del desarrollo y fisiológicos.

En literatura, destaca un grupo de ZFP que forman una subfamilia específica de plantas llamada *Q-type C2H2-ZFP*. Estas proteínas comparten el motivo de aminoácidos QALGGH altamente conservado, ubicado en el extremo N-terminal de la α -hélice del dominio C2H2-ZF [141]. Nuestros resultados filogenéticos y estructurales indican que las *VviZFPs* que integran el set C podrían corresponder a la subfamilia *Q-type C2H2-ZFP* en la vid. La presencia de otros dominios distintos a los C2H2-ZF identificados en las *VviZFPs* (dominios JmjN, JmjC, EXOIII, entre otros), podría determinar la función de estos genes, la que puede ser corroborada con trabajos de caracterización futuros.

Englbrecht y col. [60] propusieron que las proteínas de uno y dos dominios C2H2-ZF son evolutivamente más antiguas, desde las que derivaron luego proteínas con más de dos dominios. Contrastando los análisis filogenéticos con el conocimiento de funcionalidad, [61] indican que, los subgrupos antiguos suelen estar implicados en el metabolismo del ARN y la remodelación de la cromatina. Los subgrupos más jóvenes están involucrados principalmente en la regulación

transcripcional; por lo tanto, reciben un enfoque de investigación particular. El conocimiento actual es inadecuado para clasificar las C2H2-ZFP por función. Sin embargo, estudiar la estructura y clasificación de C2H2-ZFP en eucariotas ofrecerá información sobre su capacidad para combinarse con el ADN en la regulación transcripcional.

En conclusión, en este capítulo se identificaron 98 genes *C2H2-ZFP* (familia de genes *VviZFP*) en el genoma de la vid que codifican proteínas con al menos un motivo C2H2-ZF conservado. El análisis nos permite inferir una intrincada historia de evolución para la familia de genes *VviZFP* debido a los múltiples parálogos reportados y la alta heterogeneidad en las proteínas codificadas por estos genes. Finalmente, se seleccionó un grupo de genes *VviZFP* candidatos interesantes de ser estudiados en la vid, debido a las similitudes con otras C2H2-ZFP de plantas implicadas en la regulación del desarrollo del polen.

CAPÍTULO II: Localización temporal del desarrollo del polen durante el proceso de desarrollo floral en *Vitis vinifera* cv. 'Carmenere'

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Generalidades y particularidades de la vid: desarrollo de dos temporadas

La vid pertenece a una familia de plantas caducas perennes leñosas, clasificadas dentro de las dicotiledóneas basales. Posee un hábito de crecimiento, formación y desarrollo de órganos que difiere con lo descrito para plantas herbáceas anuales o para otras plantas leñosas policárpicas [44], lo que hacen de la vid un modelo interesante para la comprensión de aspectos específicos del desarrollo reproductivo de las plantas [1]. Actualmente se sabe que el proceso de formación de flores en la vid implica cuatro etapas progresivas y se lleva a cabo durante dos temporadas. Las etapas, descritas en [142] corresponden a: (1) Evocación floral, (2) Iniciación y diferenciación del primordio de inflorescencia (PI), (3) crecimiento del PI y (4) la maduración del PI con el consiguiente desarrollo de flores. Las primeras tres etapas del proceso ocurren durante la primera temporada y luego de un periodo de dormancia ocurre la cuarta etapa culminando con el desarrollo floral (durante la segunda temporada).

La evocación es el primer evento en la vía del desarrollo floral y se entiende como el proceso de cambio de un meristema vegetativo por un meristema reproductivo, el cual tiene lugar en el meristema apical (MA) [143]. Noyce y colaboradores [142] definen la evocación floral como los cambios bioquímicos y celulares irreversibles en el MA inducidos por estímulos que pueden provenir directamente del MA, o por una señal móvil (o florigeno) que induce la floración en el MA desde las hojas. El gen *FT* codifica para una pequeña proteína globular que puede traslocarse desde las hojas hasta el ápice del brote a través del floema en respuesta al fotoperiodo, desencadenando la evocación floral [144-146]. Esta vía de inducción floral derivada de las hojas, fotoperiodo-dependiente fue reportado en *Arabidopsis* y ha sido validado en otras especies, pero parece no actuar en la vid (*Vitis vinifera* cv. 'Chardonnay') [147].

La iniciación floral ocurre después de la evocación y está definida por la primera aparición de células diferenciadas en el MA. Un rasgo típico de la vid es la formación simultánea de primordios de órganos tanto vegetativos como reproductivos por el mismo ápice [17]. El ápice de la yema latente produce de tres a ocho primordios foliares (dependiendo del cultivar) y luego se divide en dos partes. La parte opuesta al primordio foliar más joven es una protuberancia meristemática conocida como primordio no comprometido o *anlage* (un término alemán para inicial o rudimentario) y su formación representa el primer paso para el desarrollo de inflorescencias. Durante los primeros dos a cinco años de la planta, a partir del *anlage* se desarrollan zarcillos (estructuras necesarias para el crecimiento vegetativo y en altura). Tras la inducción floral, pueden formarse el PI, zarcillos o brotes a partir del mismo primordio [148], configurando con distintos grados de ramificación, el brote que se desarrollará en la siguiente temporada de crecimiento. Después de la iniciación floral (en la tercera etapa), el *anlage* continúa su crecimiento pasando por diferentes etapas de crecimiento progresivo y

diferenciación del PI y posteriormente los MFs a lo largo de la primera temporada de crecimiento [149]. La cuarta etapa ocurre durante la segunda temporada de crecimiento, luego de un periodo de hibernación y considera el crecimiento de los MFs y posterior desarrollo de órganos florales (Sépalos, pétalos, pistilos y estambres), logrando así completar un proceso que requiere aproximadamente 12 meses desde la inducción floral hasta antesis.

2.1.2 Desarrollo de polen: Etapas

El desarrollo de estambres y polen es un proceso conservado en angiospermas que ha sido bien caracterizado en especies modelo como *Arabidopsis*, tomate o tabaco, pero de menor manera en la vid (Figura 17). El desarrollo de anteras en *Arabidopsis* se ha dividido en 14 etapas, basado en observaciones histológicas [150]. Los estambres son estructuras reproductivas masculinas donde ocurre la formación de gametos, formadas por anteras conectadas a una parte denominada filamento. El filamento es una estructura esbelta de origen parenquimática por donde se transporta agua y

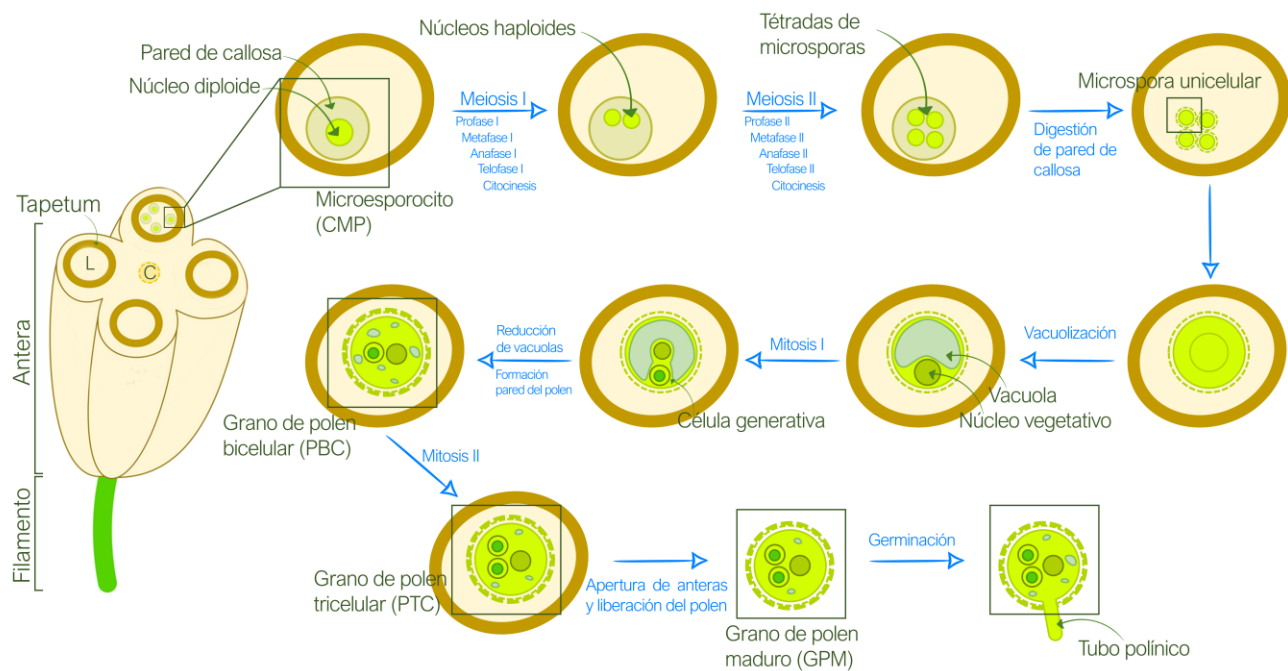


Figura 17. Diagrama representativo del desarrollo de polen en anteras de plantas con flores. Los microsporocitos se someten a dos rondas de división meiótica (meiosis I y meiosis II) para formar una tétrada de microsporas. Las tétradas luego son liberadas del tapetum, el que comienza a vacuolizarse. Posteriormente, las microsporas entran en división mitótica (mitosis I) y producen una célula generativa, conformando un grano de polen bicelular (PBC). Luego, El PBC pasa por otra ronda de división mitótica (mitosis II) para (Continuación página anterior) producir polen tricelular (PTC). L, loculo de la antera; C, tejido conectivo; CMP, célula madre del polen. Basado en [151] y [152] con modificaciones.

nutrientes a la antera a través del sistema vascular [152]. Específicamente, los granos de polen (el gametofito masculino) se desarrollan y maduran en cavidades cerradas (microsporangios) llamadas lóculos, que están delimitadas por las paredes de las anteras [153], los que a su vez se mantienen unidos al filamento a través del tejido conectivo.

En la antera, se forman dos grupos generales de células a partir del primordio de anteras (PA); las células reproductivas o esporógenas (en la zona central de la antera en desarrollo) que dan lugar a tétradas de microsporas, y las células no reproductivas que forman diferentes capas de la pared de la antera (Epidermis, entodocio, capa media y *tapetum*) [154]. El *tapetum* participa de la nutrición de las microsporas y la síntesis y secreción de sustancias que formarán la pared de los granos de polen [155], por lo que se considera un tejido del esporofito clave para el correcto desarrollo reproductivo. Las células esporógenas pasan por eventos de división celular y diferenciación hasta la formación del grano de polen maduro, en este proceso se han definido dos etapas: la microesporogénesis y la microgametogénesis.

Durante la microesporogénesis, las células esporógenas diploides se diferencian como microsporocitos o células madre de polen (CMP) y luego se dividen por meiosis para producir tétradas de cuatro microsporas haploides rodeadas de una pared gruesa de callosa. En contraste con la mitosis, la meiosis consiste en dos divisiones nucleares consecutivas sin una fase S entre la meiosis I y meiosis II. Si bien la segunda división meiótica se asemeja a la mitosis segregando cromátidas hermanas, la meiosis I es única e implica el apareamiento de cromosomas homólogos y su posterior segregación. Basándose en las características cromosómicas, la profase I (fase más larga y compleja de la meiosis) se divide en cinco subfases: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. En leptoteno, los cromosomas se tornan visibles debido a la condensación de la cromatina, además comienza el apareamiento de cromosomas homólogos. El apareamiento (o sinapsis) de cromosomas homólogos continúa durante el zigoteno, terminando esta subfase con los cromosomas en pares denominados equivalentes. Luego en paquiteno, con los cromosomas homólogos estrechamente unidos, ocurre el intercambio de fragmentos de ADN entre cromátidas no hermanas en un proceso denominado entrecruzamiento cromosómico (o *crossing over*). Durante la etapa de diploteno, los cromosomas homólogos se separan, pero permanecen unidos a través de uno o más puntos denominados quiasmas. Los quiasmas corresponden a los puntos en los que se ha producido el entrecruzamiento. Finalmente, los cromosomas continúan condensándose durante la etapa de diacinesis [156]. Los demás fenómenos que se producen en esta fase son los mismos que tienen lugar durante la profase de la división mitótica. En la mayoría de las especies, las microsporas se separan individualmente de las tétradas por lo que requieren ser liberadas de la pared de callosa que las cubre [155]. Esto ocurre mediante la actividad de una mezcla de enzimas degradadoras secretadas por las células del *tapetum* [157].

La microgametogénesis implica la transformación de microsporas unicelulares en microgametofitos maduros que contienen los gametos masculinos (granos de polen maduro; GPM). Esta etapa comienza con la expansión de la microspora, mediante la fusión de múltiples vacuolas para formar una sola vacuola grande (vacuolización) [158]. La vacuolización se

acompaña del reposicionamiento del núcleo a un sitio excéntrico contra la pared de las microsporas. La microspora polarizada luego completa una división mitótica asimétrica (mitosis de polen I; MPI) para formar dos células desiguales (PBC), una célula vegetativa grande y una célula generativa (o germinal), ambas haploides. La célula generativa, que representa la línea germinal masculina, ingresa al citoplasma de la célula vegetativa más grande (mediante la digestión de la pared callosa hemisférica que separa las dos células) para crear una estructura única de una "célula dentro de otra célula" [155]. Después de la MPI, la célula vegetativa con cromatina nuclear dispersa, sale del ciclo celular y entra en diferenciación para establecer una célula resistente a la deshidratación capaz de extender un tubo polínico de rápido crecimiento. Por el contrario, la célula germinal tiene cromatina nuclear relativamente condensada y continúa a través de una nueva ronda de mitosis (mitosis de polen II; MPII), generando un par de células espermáticas. En la mayoría de las plantas con flores (incluida la vid), los granos de polen maduran en el estado PBC hasta que son liberados de la antera. Al hacer contacto con el estigma y germinar, el tubo polínico crece a través del pistilo por extensión de la punta, guiado por señales esporofíticas y derivadas del gametofito femenino. En paralelo, la célula germinal entra a MPII dando paso a las células espermáticas que se dirigen al óvulo donde tiene lugar la doble fertilización [159]. Sin embargo, para aproximadamente un tercio de las plantas, incluidas *Arabidopsis*, arroz y maíz, la MPII ocurre mientras el polen todavía está confinado a la antera y durante la dehiscencia se desprenden granos de polen maduro tricelular (GPM) [160]. Durante la maduración del polen, la célula vegetativa acumula reservas de carbohidratos y/o lípidos para apoyar el metabolismo activo necesario en la germinación y crecimiento del tubo polínico [161]. La microsporogénesis y microgametogénesis son esenciales para la propagación en las plantas con flores. Al mismo tiempo, estos eventos del desarrollo involucran varios procesos celulares fundamentales, incluida la división y diferenciación celular, la comunicación célula-célula y la muerte celular programada (MCP).

2.1.3 Regulación molecular del desarrollo del polen

Durante el último cuarto de siglo, se ha logrado comprender en gran medida el control genético molecular del desarrollo del estambre y el polen en varios sistemas modelo. Los primeros estudios moleculares en tabaco, *Brassica spp.* y tomate proporcionaron estimaciones del número de genes expresados en el estambre en desarrollo e identificaron genes específicos de anteras o polen. La progresión de microsporas en proliferación a polen diferenciado se caracteriza por la represión a gran escala de genes del programa de desarrollo temprano y la activación de un programa único de expresión génica tardía en el polen en maduración [162]. Este proceso está finamente regulado a nivel molecular, considerando que los patrones de expresión en el polen difieren notablemente con los tejidos somáticos a nivel transcriptómico [53] y que varían marcadamente durante las etapas del desarrollo de anteras [162]. La búsqueda y caracterización de líneas mutantes con defectos en el desarrollo de estambres/anteras, desarrollo de polen y liberación de los granos de polen maduro ha

permitido individualizar genes claves para el proceso. El uso de estos mutantes ha indirectamente proporcionado evidencia de la expresión génica en el gametofito masculino [163].

Se han identificado varios genes necesarios para el desarrollo normal de las anteras y polen [164]. Específicamente, se requieren los genes con función B y con función C para especificar la identidad del estambre. Indirectamente, se considera que los genes con función A participan en el control de la identidad del estambre porque antagonizan con los genes de función C, de modo que en ausencia de la función A, los estambres se forman ectópicamente [164,165]. En *Arabidopsis*, la función A requiere los genes *AP1* y *AP2*, la función B necesita los genes *AP3* y *PI*, y el gen *AG* es esencial para la función C. Por lo tanto, las mutaciones en cualquiera de los genes *AP3*, *PI* y *AG* causan defectos en la identidad del estambre [166]. Los estudios moleculares indican que *AP3*, *PI* y *AG* se expresan inicialmente en regiones del meristemo floral que formarán primordios de estambres y su expresión continúa detectándose en primordios de estambres y estambres en desarrollo [164,167,168]. Además, la expresión ectópica de *AP3*, *PI*, *AG* provoca la formación de estambres ectópicos en la flor [169,170].

Se han identificado otros genes, además de los (A)B(C), que afectan la identidad y el desarrollo de los órganos del estambre. La mayoría de estos interactúan genéticamente con los genes de función B, *AP3* y *PI*, y/o el gen de función C, *AG*. Uno de los más importantes es el gen de identidad del meristemo *LFY*. Las flores en líneas mutantes *lfy* carecen de estambres y/o producen estambres anormales [171,172]. El gen *SPOROCTELESS/NOZZLE* (*SPL/NZZ*), que codifica para un factor de transcripción [173,174], es necesario para la especificación del tipo celular en los órganos reproductores masculinos y femeninos [173,175]. Las anteras en *spl/nzz* carecen de endotecio, capa media, tapetum y meiocitos. El control del número de células esporógenas y los eventos de división celular está regulado por *EXTRA SPOROGENOUS CELLS/EXS MICROSPOROCTES1* (*EXS/EMS1*) que codifica para un receptor quinasa del tipo repetición rica en serina treonina leucina (*serine threonine leucine rich repeat receptor kinase*, LRR-RK) [176,177] y *TAPETAL DETERMINANT1* (*TPD1*) que codifica para una proteína pequeña [178]. Ambas proteínas forman un complejo proteico siendo *TPD1* el ligando de *EXS/EMS1*. El fenotipo en *exs1/ems1*, carece de tapetum y capa media en las anteras, las que son reemplazadas por un número anormal de meiocitos adicionales [179]. De igual manera, el mutante *tdp1* es estéril debido a un bloqueo durante la meiosis II causado por la ausencia de tejido tapetal [178]. Otros receptores quinasas del tipo repetición rica en leucina (*leucine-rich repeat receptor-like*, LRR-RLK) participan en etapas tempranas tales como *BARELY ANY MERISTEM1* (*BAM1*) y *BARELY ANY MERISTEM2* (*BAM2*) [180]. *BAM1* y *BAM2* tienen función redundante en el control de la diferenciación de células parietales para la formación de las capas de la antera (tapetum, capa media y endotecio). En el mutante *bam1bam2*, las células al interior de la epidermis en las anteras tienen aspecto a CMP que posteriormente se degeneran, lo que sugiere que *BAM1/BAM2* controla el número de células esporógenas al promover la diferenciación de las células somáticas circundantes [180]. Otros LRR-RLKs como *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* (*SERK1*) y *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE2*

(SERK2) de función redundante están relacionados con el desarrollo del *tapetum* y diferenciación celular en etapas tempranas [181,182]. El fenotipo en líneas *serk1/serk2* es similar a lo observado en mutantes *exs1/ems1* y *tdp1*, con ausencia de tejido tapetal y exceso del número de esporocitos [181,182]. Algunos factores de transcripción del tipo hélice-bucle-hélice básico (*basic helix-loop-helix*; bHLH) como *DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1)* han sido vinculados a este proceso, río abajo de la acción de *SPL/NZZ* y *EXS/EMS1*. *DYT1* presenta una expresión alta en *tapetum* durante la etapa en que se observan CMP y una expresión menor en estas células. En el mutante *dyt1* la especificación de las capas celulares en la antera ocurre de manera normal en etapas tempranas, pero luego durante la meiosis del polen, el *tapetum* presenta un desarrollo anormal. Las CMP son capaces de alcanzar la etapa de meiosis I en *dyt1*, las que eventualmente colapsan debido a que carecen de la pared de callosa, impidiendo así completar la citocinesis [183]. Además, se ha reportado el factor de transcripción ABORTED MICROSPORES (AMS) de la subclase MYC de la familia bHLH. La expresión de *AMS* se detecta débilmente en yemas premeioticas y mayormente en yemas cerradas post-meioticas [184]. *AMS* actúa como regulador maestro de la expresión de genes del *tapetum*, asociados con la síntesis y función del tejido [185]. En el mutante *ams* las microsporas se degeneran tempranamente debido a una pared de callosa disminuida y a la ausencia de sustancias secretadas por el *tapetum* [185]. Factores del tipo MYB también se han relacionado al desarrollo del polen. En *Arabidopsis*, *AtMYB80* codifica para un factor de transcripción R2R3 MYB y se expresa en *tapetum* y microsporas en desarrollo [186,187]. El *tapetum* en el mutante *atmyb80* se degrada anticipadamente y el polen colapsa, generando flores macho-estériles [187,188]. Los genes *MYB33* y *MYB65* de *Arabidopsis* presentan una alta similitud con el gen *GAMYB* de *Hordeum vulgare* L., un componente de la ruta de señalización de GA en la semilla y que participa en el desarrollo de anteras y polen [189,190]. Se ha demostrado que *MYB33* y *MYB65* cumplen una función redundante en el desarrollo del polen en *Arabidopsis*. En el doble mutante *myb33myb65*, el *tapetum* se degenera en la etapa de CMP, lo que resulta en un aborto del polen previo a la meiosis [189]. Sin embargo, la condición de esterilidad en *myb33myb65* es condicional, ya que estímulos como mayor radiación lumínica o temperaturas bajas aumentan la fertilidad en el doble mutante. Esto indica que *MYB33/MYB65* facilitan el desarrollo de anteras, pero no son esenciales para el proceso [189]. Otro factor de transcripción reportado es MALE STERILITY1 (MS1) de la familia *plant Homeodomain (PHD)-finger*. Se ha demostrado que *MS1* es crucial para la formación de la pared del polen y la MCP del *tapetum* [191,192]. La expresión de *MS1* se detecta débilmente en las anteras de yemas cerradas, presentando su *peak* de expresión en el *tapetum* durante la etapa de liberación de microsporas [191]. En *ms1*, el polen inmaduro se degenera poco después de la liberación de microsporas. El *tapetum* en esta línea mutante se ve alterado y las microsporas presentan una formación incompleta de la pared del polen [193].

Dado que el desarrollo del polen involucra eventos de división celular, es de esperar que los componentes de la maquinaria del ciclo celular desempeñen un papel esencial en el control de la división mitótica en la línea germinal masculina. En *Arabidopsis*, se han reportado dos líneas mutantes con fenotipos similares, *cdka;1* y *fbl17*; en ambas líneas se

reduce la actividad de la quinasa dependiente de ciclina de tipo A-1 (*Cyclin-dependent kinase A-1; CDKA;1*) limitando la proliferación de células germinales [155]. *CDKA;1* es esencial para la división celular de la célula generativa durante la microgametogénesis [156]. En el polen del mutante *cdka;1*, solo se produce una célula espermática, en lugar de dos. El polen mutante es viable, pero solo puede fertilizar una célula del saco embrionario [194], dando lugar a un embrión que luego aborta, debido a la falta de endospermo funcional [195]. Por su parte, en el mutante *fb17* se interrumpe la expresión de *FBL17* que codifica para una proteína del tipo F-box, que interactúa con reguladores del ciclo celular para su degradación [195]. La expresión de *FBL17* se detecta transitoriamente en la célula generativa durante la fase de PBC, donde la proteína *FBL17* se dirige a *cyclin-dependent kinase inhibitor 6 (KRP6)* y *Cyclin-dependent kinase inhibitor 7 (KRP7)*, dos inhibidores de *CDKA;1*, para ubiquitinar y posteriormente degradar la quinasa por el proteosoma [155]. De esta manera, la célula generativa progresa a la fase S. En *fb17* por el contrario, la ausencia de *FBL17* junto con la persistencia de *KRP6/7* mantiene niveles bajos de la actividad de *CDKA;1*, limitando el potencial de la célula vegetativa para volver a entrar al ciclo celular. Por lo tanto, la expresión específica de *FBL17* en la línea germinal permite el control diferencial del ciclo celular en las líneas celulares que componen el polen, regulando eficazmente la progresión de la célula germinal a la fase S del ciclo celular [155,195]. Otros genes se han vinculado a procesos posteriores a la maduración del grano de polen, como los genes *GENERATIVE CELL-SPECIFIC1/HAPLESS2 (GCS1/HAP2)* y *GAMETE-EXPRESSED PROTEIN2 (GEX2)*, caracterizados con las líneas mutantes generadas en esos *loci*. En ambas líneas se produce GPM tricelular, pero la fertilización se reduce drásticamente [196-198]. De manera interesante, la expresión de *GCS1/HAP2* es regulada por las C2H2-ZFP *DAZ1/DAZ2* [77], reafirmando así la participación de estas proteínas en la regulación del desarrollo reproductivo.

Como se ha indicado, el desarrollo reproductivo en plantas es un proceso bien regulado, que involucra la participación de factores de transcripción y que en el último tiempo se ha logrado comprender en gran medida en especies modelo como *arabidopsis* y arroz [179]. Sin embargo, los mecanismos moleculares equivalentes en otras especies cultivadas (como la vid) son poco conocidos. Aun así, en el genoma de la vid se encuentran posibles genes ortólogos a los descritos en *arabidopsis* u otros modelos, por lo que su función en la regulación del desarrollo de anteras y polen requiere ser dilucidado.

2.1.4 Desarrollo floral en la vid: escalas disponibles

La identificación de las etapas de crecimiento es importante a la hora de tomar decisiones sobre el establecimiento y operaciones agronómicas, además permite la estandarización de resultados y coordinación de la investigación experimental realizada en la especie. En este sentido, para la vid se han publicado cuatro sistemas descriptivos a la fecha: en 1952, el sistema de Baggioolini [199], en 1977 el sistema de Eichhorn y Lorenz (EL) [200], en 1994 la adaptación a la vid del

sistema BBCH (sistema diseñado para estandarizar términos en la Unión Europea)[200] y en 1995 el sistema E-L modificado por Coombe [201], utilizado mayoritariamente en la actualidad.

El sistema de Baggiolini fue el primero propuesto, y cubre el periodo desde la brotación hasta el *setting* frutal dividido en 10 etapas indicadas con letras desde A hasta I. Este sistema fue ampliamente utilizado en los programas de aplicación de plaguicidas dado su facilidad de uso y claridad de los dibujos representativos, pero fue luego reemplazada debido que cubre un periodo acotado y no prevé estadios intermedios del desarrollo [201]. El sistema EL repara en esto y propone 22 etapas desde “yema invernal” hasta el “final senescencia foliar”. Además, utiliza una extensión de 47 números con espacios, lo que permite insertar etapas intermedias y actualizar el sistema conforme avanza la investigación.

El sistema BBCH proviene del esfuerzo dentro de la Unión Europea para adoptar un código uniforme, integrando la mayoría de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas cultivadas. Este sistema enumera diez macroetapas (o etapas principales de crecimiento) cubriendo todo el desarrollo desde germinación/brotación hasta senescencia/latencia. Dentro de cada macroetapa hay hasta diez microetapas (o etapas de crecimiento secundario) que dan un sistema completo con números del 00 al 99. La adaptación de este sistema a la vid incorporó siete nuevas macroetapas y se omitieron tres que no correspondían a la especie [201]. Una desventaja de este sistema es que debido a su estructura tiende a fragmentarse o a seguir un zig-zag en lugar de un flujo continuo. Por esto, Coombe [201] propuso una actualización al modelo E-L de 47 etapas, cambiando términos poco utilizados y reparando algunos errores detectados para generar el sistema de Eichhorn y Lorenz modificado (sistema E-L) (FIGURA 18). El sistema E-L es el mayoritariamente utilizado en la actualidad, tanto en programas de aplicación de plaguicidas como en la investigación realizada en vid.

Desafortunadamente, ninguno de estos sistemas indica una relación entre el progreso del desarrollo floral y la fenología específica del desarrollo de anteras y polen. Por lo tanto, este capítulo busca relacionar/posicionar el proceso del desarrollo del polen en la escala del desarrollo floral descrita en el sistema E-L, para comprender de mejor manera los perfiles de expresión de los genes *VviZDP* candidatos. Para esto, se observó mediante microscopía confocal el contenido de anteras en un set de muestras de *Vitis vinifera* cv. ‘Carmenere’ durante la expresión génica de varios genes homólogos a los descritos previamente, a modo de integrar ambas aproximaciones y definir los estadios del desarrollo floral en que ocurre el desarrollo del polen.

Objetivo específico a desarrollar:

2. Localizar el desarrollo del polen dentro del contexto del desarrollo floral en *V. vinifera* cv ‘Carmenere’

Se propone dar cumplimiento a este objetivo mediante la caracterización fenológica de un set de muestras de *V. vinifera* cv ‘Carmenere’ que consideren el desarrollo floral en la segunda temporada de crecimiento. Además, la identificación de estado del

desarrollo del polen en esas muestras mediante microscopía y el análisis de expresión relativa de genes homeóticos y putativos ortólogos a los ya relacionados a este proceso en otros modelos vegetales.

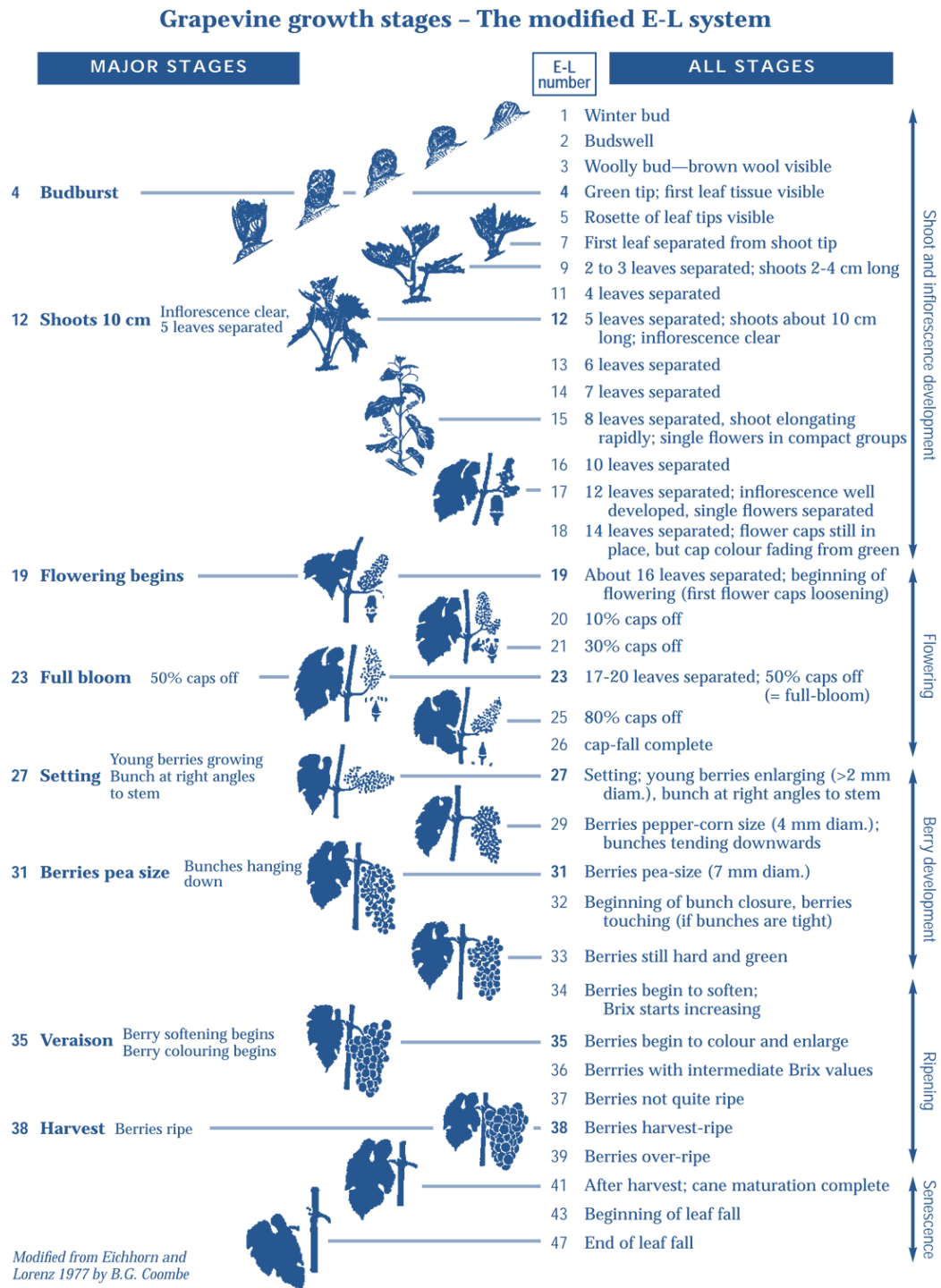


Figura 18. Esquema del sistema E-L modificado utilizado para caracterizar las etapas del desarrollo de la vid [201].

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Material vegetal y preparación de muestras

El material vegetal utilizado en este trabajo se obtuvo desde una plantación clonal de *V. vinifera* cv. 'Carmenere' mantenidas en la viña Los Lingues, ubicada en la Hacienda Los Lingues, Valle de Colchagua, Región del Libertador Bernardo O'Higgins, durante la temporada de crecimiento 2018-2019. El sector presenta clima mediterráneo, cálido y sub-húmedo. Se realizaron 8 colectas en distintos tiempos, basándose en el tamaño de inflorescencia desde los 2 cm hasta los 10 cm. Las muestras usadas en los análisis de microscopía se dejaron en solución de fijación etanol/ácido acético (3:1 v/v) a 4°C [202], y las muestras para los análisis de expresión fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su uso para la extracción de ARN. Cada colecta se realizó cerca de las 10:00 a.m. para descartar posibles oscilaciones (propias del ciclo circadiano) en los niveles de transcritos de los genes evaluados.

2.2.2 Estudio de la fenología floral y definición de estado en el sistema E-L

Para caracterizar cada muestra, se seleccionaron aleatoriamente una muestra de veinte inflorescencias (de plantas distintas) del mismo tamaño y se registró la longitud del brote y el número de hojas separadas (de acuerdo a lo reportado en [201]). El rango del desarrollo evaluado fue escogido en base a observaciones preliminares (resultados no presentados). El tiempo de muestreo fue desde septiembre a diciembre del 2018, colectando cada 5-10 días entre muestras.

2.2.3 Preparados, tinción DAPI y microscopía

Para examinar el estado del desarrollo del gametofito masculino en las muestras de estudio, se seleccionaron 3-6 flores aleatoriamente del tercio basal (más cercano al pedúnculo), medio y apical del racimo. Esto considerando que el desarrollo de las flores en la inflorescencia ocurre de manera asincrónica. De cada flor, se aislaron las anteras manualmente con bisturí y pinza bajo un microscopio estereoscópico en una gota de solución de fijación para evitar la deshidratación de las muestras. Luego se realizó un corte en un extremo de la antera y aplastando suavemente se vació su contenido en un portaobjetos de microscopio con una gota de solución DAPI (Buffer fosfato 0.1M pH 7, EDTA 1mM, Triton X-100 0,1%, DAPI 1 µg/ml SIGMA) de acuerdo a [203] y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 20 minutos. Las señales de fluorescencia se analizaron con un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX43; Tokio, Japón) acoplado a colimador (CoolLED pE-2; Andover, UK). La longitud de onda de excitación máxima de DAPI fue 408 nm. Las imágenes de campo claro y fluorescencia DAPI fueron capturadas con el software ZEISS. En las muestras con GPM se colectó el polen en un tubo de 1.5 ml y se incubó a 35°C por 20 minutos, luego se montó en un portaobjetos bajo un cubreobjetos y se visualizó en microscopio confocal Zeiss LSM780.

2.2.4 Identificación de genes

Se seleccionaron 16 genes del genoma de la vid (genes homeóticos, de expresión temprana en anteras, vinculados al *tapetum* y de microgametogénesis) basados en la identidad con los descritos en otros modelos vegetales. Para esto, se utilizó BLASTN 2.2.29+ [204] en la base de datos de la versión 12X.2 del genoma de referencia de *Vitis vinifera* [78]. Todas las secuencias fueron verificadas mediante un alineamiento por pares en Clustal Omega [85,86].

2.2.5 Alineamiento global de secuencias y análisis filogenético

Los alineamientos múltiples de secuencias de proteínas se realizaron en el programa Clustal Omega con parámetros predeterminados [85,86]. El análisis filogenético se realizó con el software MEGA X (versión 10.2.2) [87] mediante el método *Neighbor-Joining* [88] y la fiabilidad del análisis se evaluó con el método de remuestreo *Bootstrap* usando 1000 repeticiones.

2.2.6 Extracción de RNA total y síntesis de ADNc

Para la extracción de ARN total se usó el método propuesto por Reid y colaboradores [205]. La integridad y calidad del ARN total fueron verificadas electroforéticamente en un gel de agarosa/formaldehído teñido con bromuro de etidio y por una relación de absorbancias a 260 nm/280 nm mayor que 1,95. La concentración de los ácidos ribonucleicos fue determinada espectrofotométricamente con el equipo Infinite[®] 200 PRO NanoQuant de TECAN. Las muestras de ARN seleccionadas para qRT-PCR fueron tratadas con TURBO DNA-free™ Kit TURBO™ de Ambion, y chequeadas por qPCR (o reacción RT-) usando partidores para el gen *VviGAPDH* (VIT_17s0000g10430). Se realizaron cuatro extracciones independientes para cada estadio. La síntesis de ADNc se llevó a cabo a partir de al menos 1µg de ARN purificado con el kit *Superscript First-strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.2.7 Diseño y almacenamiento de partidores para qRT-PCR

Desde las secuencias obtenidas previamente se diseñaron partidores específicos para evaluar la expresión relativa de los genes de estudio. Con la herramienta en línea *Primer-Blast* [206] se diseñaron 10 pares de partidores para cada gen y se seleccionó el mejor par en base a valores de auto-complementariedad y auto-complementariedad en 3' bajos. La auto-complementariedad es la probabilidad de que un partidor se una a sí mismo y al otro partidor del par; mientras que la auto-complementariedad en 3', es la probabilidad de que el partidor se una a sí mismo y al otro partidor del par en el extremo 3'. Las puntuaciones altas son un buen predictor de la formación de dímeros de partidores. La síntesis de partidores fue realizada por *Integrated DNA Tech*, Coralville, EEUU. Finalmente, los partidores (Tabla 3) se validaron mediante qPCR con 2µl de ADNc (25ng/µl) de vid (Material previamente obtenido en el laboratorio). Los partidores liofilizados fueron disueltos en el volumen necesario de buffer TE (10 mM Tris-Cl, pH 7.5; 1 mM EDTA) para alcanzar una concentración *stock* de 100 µM (100

pmol/μl). Finalmente, se generaron diluciones a la concentración de trabajo (10 mM) con agua libre de nucleasas. Las soluciones *stock* de partidores se conservaron a -20°C.

Tabla 3. Descripción de partidores utilizados en análisis de expresión relativa.

Secuencia	Nombre partidor	Partidor	Secuencia (de 5' a 3')	Tm (°C)	Tamaño producto
<i>VviAP3</i>	VviAP3_F	Forward	AGGCAGGTACCTACTCCAA	56,9	556
	VviAP3_R	Reverse	GGGCAAATACCGAGAGCTT	55,3	
<i>VviSEP1</i>	VviSEP1_F	Forward	TTTGTGATGCTGAGGTCGCT	59,9	490
	VviSEP1_R	Reverse	TGAGACTGAGCTTGCTGGTG	59,9	
<i>VviMADS1/AG1</i>	VviAG1_F	Forward	AGTCACCTTCTGTAAGCGCC	60	606
	VviAG1_R	Reverse	GTTTGGTCGTGGCGAGAGTA	60	
<i>VviSEP3</i>	VviSEP3_F	Forward	TGGGGAGAGGTAGGGTTGAG	60	664
	VviSEP3_R	Reverse	TCGGGCTGGTATCCGATTTG	59,9	
<i>VviAP1</i>	VviAP1_F	Forward	CAAGAGGAGGACTGGGTTGC	60,3	496
	VviAP1_R	Reverse	CTGCTCCAATGTGCTGCT	60,3	
<i>VviPI</i>	VviPI_F	Forward	AACTCAAGCAACAGGCAGGT	60,1	357
	VviPI_R	Reverse	GCCAATCTCAAGGGCATCCT	60,1	
<i>VviMS1</i>	VviMS1Fw1	Forward	CCTTCCGTGAAAATGTGGCG	60,1	316
	VviMS1Rv1	Reverse	ATGCTCCTCTCACCCCTCCT	60	
<i>VviAMS</i>	VviAMSFw1	Forward	GGGTATGATGTTAATTGCAGGAG	57,3	428
	VviAMSRv1	Reverse	CTGGAATCAGGAGCCAGTC	59,8	
<i>VviBAM1</i>	VviBAM1Fw1	Forward	CTTGGTCCGGTACTGGTC	60	188
	VviBAM1Rv1	Reverse	AGCAAACAAGCAGCCCAATG	60	
<i>VviDYT1</i>	VviDYT1Fw1	Forward	GCGGGCATTAGTCCCTATCA	59,3	164
	VviDYT1Rv1	Reverse	TGGTTTCGCTCCTCTGCTTT	59,9	
<i>VviEMS1</i>	VviEMS1Fw1	Forward	TCCATTGCCGGAGCAAATCT	60	256
	VviEMS1Rv1	Reverse	TGACAGCATTGGGAGCTCTG	60	
<i>VviSERK1</i>	VviSERK1Fw1	Forward	CTCCACCTCCCCATTTGTC	60	335
	VviSERK1Rv1	Reverse	AGCCACAAGAGAACCATCCG	60	
<i>VviMYB33</i>	VviMYB33/65Fw1	Forward	AGGACCCATTGCCTTTTGCT	60,2	212
	VviMYB33/65Rv1	Reverse	TGTCCAGATGGTGGAGACT	59,9	

Tabla 3. Descripción de partidores utilizados en análisis de expresión relativa. Continuación (2)

<i>VviMYB103</i>	VviMYB80/103Fw1	Forward	TTGGAAACGAAGGCGATGGA	60	184
	VviMYB80/103Rv1	Reverse	TCCCATAGGACGCAGTCTGA	60	
<i>VviCDKA;1</i>	VviCDKA1Fw1	Forward	CTGCTTGGATCACGCCACTA	60,1	108
	VviCDKA1Rv1	Reverse	AATCTCCGAGTCCCCAGGAA	59,9	
<i>VviFBL17</i>	VviFBL17Fw1	Forward	TAACTGTGGCAGGTGTGGTC	59,9	125
	VviFBL17Rv1	Reverse	GCAGGTGCGTATATTGCTGC	60	

2.2.8 Análisis de expresión cuantitativa de los genes en estudio (qRT-PCR)

La expresión génica se cuantificó mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR). Se consideraron cuatro repeticiones biológicas (correspondiente a las extracciones independientes) y tres repeticiones técnicas por cada una de estas, de acuerdo a la metodología descrita por [41]. Las reacciones se realizaron en un termociclador *Mx3000P qPCR System* de Agilent y en todas las reacciones se utilizó el kit *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* de Thermo Scientific de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Para esto, se consideró un volumen de 2 μ l de *Master Mix*, 250 nM de cada partidor, 50 ng de cDNA y agua libre de nucleasas hasta un volumen de reacción final de 20 μ l. La amplificación fue seguida de una curva de desnaturalización generada mediante la lectura continua de fluorescencia durante un incremento de temperatura desde 65 $^{\circ}$ C a 95 $^{\circ}$ C, que sirvió para descartar muestras con patrones alterados en las curvas de desnaturalización tales como “doble *peaks*” o “*peaks* con mesetas”, que indican alteraciones en la amplificación y obtención de productos inespecíficos (dímeros de primers o amplificación de más de un producto). Para determinar la expresión relativa se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ [207] y para la normalización se utilizó el gen *VviGADPH* (Locus: VIT_217s0000g10430) como gen de referencia, probado previamente en el laboratorio.

2.2.9 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en R usando el paquete *Rcmdr* (R Commander) versión 2.7-1. Luego de verificar la hipótesis de distribución normal de las variables evaluadas se realizaron las pruebas estadísticas mediante ANOVA de una vía. Posteriormente, las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas en los niveles de expresión entre las muestras evaluadas (valor-p, 0.05). Los gráficos se realizaron con el software *GraphPad Prism* versión 9.1.0 en Microsoft Windows 10.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Las muestras colectadas representan el desarrollo floral desde la etapa E-L12 a E-L19

El crecimiento activo durante la segunda temporada en la vid es notorio y constituye los pasos finales para el desarrollo de la semilla y frutos. Las muestras colectadas representan un momento del desarrollo floral en vid desde una inflorescencia de 2 cm, en brotes de aproximadamente 13 cm de longitud con 6 hojas separadas en promedio; hasta inflorescencias de 10 cm, en brotes de 56.6 cm con 13 hojas separadas en promedio (Tabla 4). Esto indica que durante los casi 30 días de seguimiento las inflorescencias crecieron en promedio cinco veces su tamaño y los brotes crecieron más de cuatro veces. A su vez, el número de hojas separadas se duplicó, probablemente para solventar los requerimientos de fotosintatos que requiere el desarrollo floral y frutal. Comparando las etapas descritas en el sistema E-L, se propone que la muestra 1 corresponde a la etapa E-L12 y la muestra 8 corresponde a la etapa E-L19. Entre estas, el set de muestras obtenidas representa las etapas E-L13, E-L14, E-L15, E-L16, E-L17 y E-L18 del desarrollo en vid.

Tabla 4: Resumen de las variables fenotípicas y las etapas del sistema E-L propuestas para el set de muestras del estudio. Todas las fechas corresponden al año 2018.

Muestra	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Fecha de muestreo	16-oct	16-oct	23-oct	31-oct	31-oct	08-nov	08-nov	15-nov
Tamaño Inflorescencia (cm)	2	3	4, 5	6	7	8	9	10
Largo de brote cm (SD)	13.1(1.1)	18.7(4.1)	26.5(5)	40.9(8.5)	39.8(10)	46.3(13.2)	48.5(16)	56.6(15.1)
Nº de hojas separadas (SD)	6(0.4)	7(0.8)	9(0.8)	10(0.8)	10(0.9)	10(1.1)	12(1)	13(1.3)
Etapas E-L propuesta	12	13	14	15	16	17	18	19

2.3.2 El desarrollo del polen se observa desde la etapa E-L13 a E-L16

Se determinaron diferentes etapas de la meiosis del polen I y II basándose en la organización de los cromosomas en núcleos marcados con DAPI. En E-L12, es posible distinguir la inflorescencia, pero las flores individuales están conformando grupos compactos. Las anteras en esta etapa aún no se desarrollan completamente por lo que las células al interior aún corresponden a tejido esporofítico.

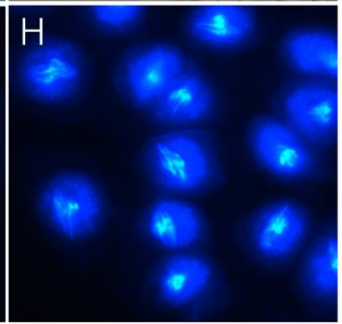
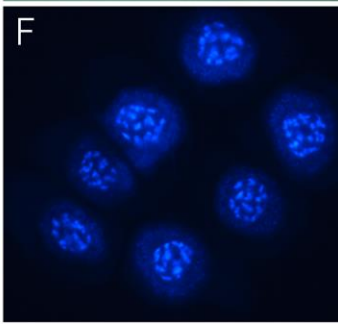
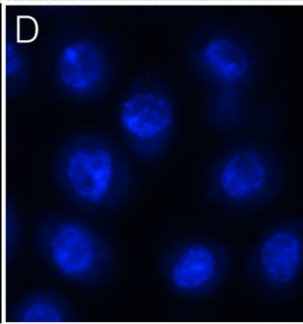
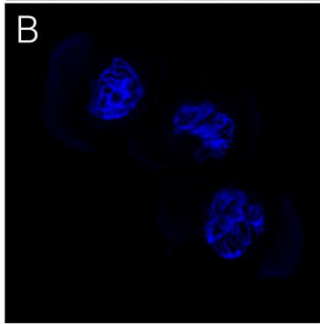
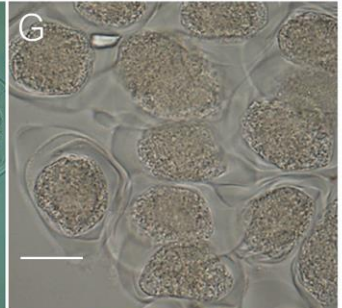
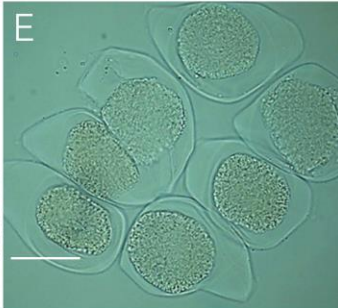
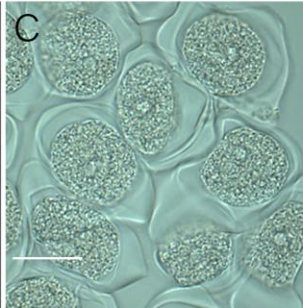
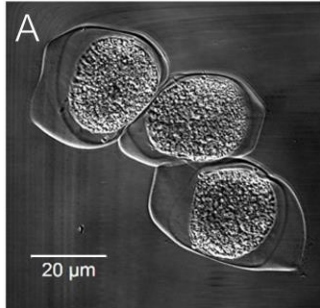
Profase I

CMP

Zigoteno

Diacinesis

Metafase I



Telofase I

Anafase II

Tétradas de microsporas

Granos de polen

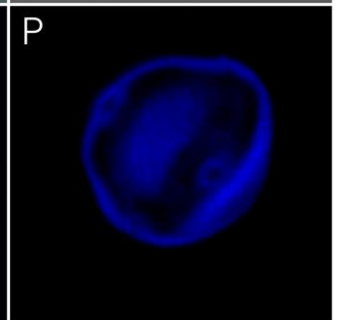
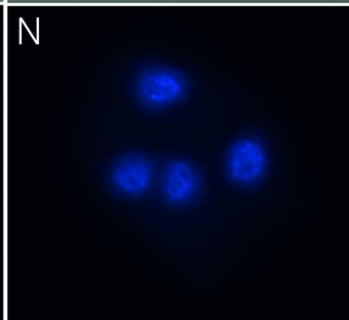
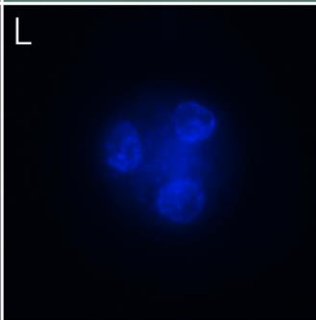
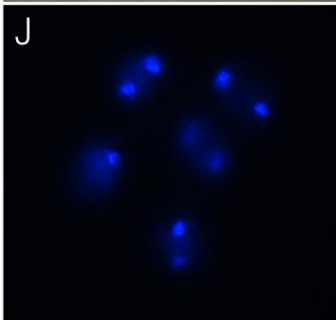
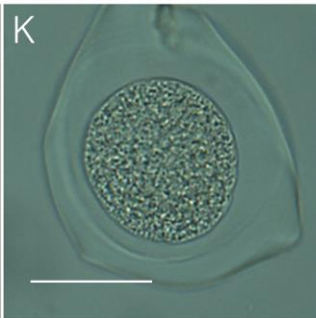


Figura 19 (Página anterior). Etapas del desarrollo del microgametofito identificadas en el cultivar 'Carmeneré'. Las diferentes etapas de la meiosis fueron identificadas en células obtenidas por vaciado de anteras. Los paneles A, C, E, G, I, K, M y O fueron tomadas en campo claro, mientras que los paneles B, D, F, H, J, L, N, P a la fluorescencia de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). CMP, células madres del polen.

En E-L13 las flores individuales aumentan de tamaño lo que permite la identificación y disección de anteras con mayor facilidad. En esta muestra, el contenido de las anteras vaciadas corresponde mayoritariamente a CMP (Figura 19. A-B). En estas células, la cromatina se presenta descondensada, presumiblemente debido a una alta actividad transcripcional propias del desarrollo (Figura 19. B). Además, es visible la capa de callosa característica de este tipo celular (Figura 19. A). Entre E-L14 y EL-15, se identificaron distintas fases de la meiosis lo que da cuenta de que la microgametogénesis está ocurriendo en estas etapas (Figura 19. C-L). Las células en profase I tienen un aspecto similar a las CMP en campo claro pero la cromatina al interior del núcleo comienza a condensarse, siendo notorio en las células en diacinesis (Figura 19. E-F). Las células en metafase I presentan cromosomas homólogos alineados en un plano ecuatorial del huso, constituyendo probablemente la placa metafásica (Figura 19. G-H). No fue posible detectar células en anafase I al menos en las muestras observadas. Por su parte, las células en telofase I presentan la polarización de los cromosomas a los extremos de la célula, donde probablemente se está desarrollando la envoltura de los nuevos núcleos. En Figura 19. I-J las células están en telofase previo a la división del citoplasma (citocinesis), lo que se puede observar en campo claro. De la meiosis II solo fue posible identificar células en anafase II (Figura 19. K-L), las que se caracteriza por los cromosomas migrando a los polos. En Figura 19. L se pueden observar tres de los cuatro núcleos, debido a que el cuarto se encuentra fuera del plano focal. En las flores de E-L15 también se observaron células en tétradas de microsporas (Figura 19 M-N), donde la cromatina presenta un estado descondensado, probablemente debido a la actividad transcripcional que se desarrolla durante la microgametogénesis. En el estado de tétradas de microsporas, las células están rodeadas de una pared de callosa, posteriormente las microsporas se liberan y maduran individualmente (con rondas de división y diferenciación) hasta la formación de GPM. No se encontraron estadios intermedios entre el estado de tétradas y GPM. En E-L16 se encontraron mayoritariamente GPM (Figura 19. O-P), que se caracterizan por no presentar la pared de callosa y una pared del polen notoria en campo claro. En estas células, además se observa un núcleo de mayor tamaño y uno de menor tamaño correspondiendo probablemente al núcleo de la célula vegetativa y germinativa respectivamente.

Basado en las observaciones descritas, contrastado con las etapas del sistema E-L evaluadas (Tabla 5), se propone que el desarrollo del polen en *Vitis vinifera* cv. 'Carmeneré' ocurre entre las etapas E-L12 al E-L15, donde si bien no se observaron todas las fases de las distintas divisiones celulares, se logró detectar los estados tempranos y finales del proceso dando cuenta del momento del desarrollo floral en que se está llevando a cabo el desarrollo del gametofito masculino.

Tabla 5: Fases observadas por microscopía de fluorescencia en las muestras de estudio

Etapa E-L	Fases observadas
E-L12	CMP
E-L13	CMP
E-L14	CMP, MICROESPOROGÉNESIS
E-L15	MICROESPOROGÉNESIS, TETRADA, GPM
E-L16	TETRADA, GPM
E-L17	GPM
E-L18	GPM
E-L19	GPM

2.3.3 Los genes evaluados presentan en algunos casos, patrones de expresión coherentes con el desarrollo del polen

El control de los procesos fisiológicos mediante regulación de la expresión génica a nivel transcripcional es clave para el desarrollo tejido específico y la interacción con el ambiente. La integración de estímulos ambientales y la expresión de genes de respuesta es controlada por factores de transcripción, actuando como interruptores moleculares de cascadas regulatorias. En este trabajo se realizó la búsqueda de un set de genes en el genoma de la vid, basándose en las secuencias de genes reportados en el genoma de *Arabidopsis* [208] y utilizando las secuencias predichas en la versión 12X.v2 [78] del genoma de referencia 12X PN40024 [133] de la vid. Con esta búsqueda, se identificaron 6 genes homéoticos y 10 genes vinculados al desarrollo de anteras y polen. De estos 10, 3 fueron agrupados como de expresión temprana, 3 de expresión en tapetum y 4 como genes relacionados a la microgametogénesis. La nomenclatura de los genes seleccionados (basada en [209,210] y en la nomenclatura usada en los diferentes artículos relacionados), el ID en el genoma 12X.v2 PN40024 junto con el putativo ortólogo de *Arabidopsis* se detalla en la tabla 6. Se realizó un análisis filogenético con secuencias traducidas de aminoácidos, para comprender las relaciones filogenéticas entre los genes evaluados y genes ortólogos de otras especies (Figura 20). En términos generales, la estructura primaria de las proteínas es conservada entre grupos de proteínas lo que confirma la estructura de los genes seleccionados. Las proteínas de vid suelen agruparse mayormente con proteínas de especies leñosas como alamo, cacao (*Theobroma cacao* L.) o papaya (*Carica papaya* L.).

El primer grupo de genes considerados en el presente estudio es representado por los genes homeóticos que participan del modelo (A)B(C). Todos ellos presentaron dinámicas de expresión en las muestras evaluadas (Figura 21). La acumulación de transcritos de *VviAP1* decrece conforme avanza el desarrollo del polen.

Tabla 6: Genes evaluados en análisis de expresión génica

Grupo	Gen	PN40024 12X.v2	Mejor match en arabidopsis
Genes homeóticos	<i>VviAP1</i>	VIT_01s0011g00100	AT1G69120, AP1/AGL7
	<i>VviAP3a</i>	VIT_18s0001g13460	AT3G54340, AP3/ATAP3
	<i>VviPI</i>	VIT_18s0001g01760	AT5G20240, PI
	<i>VviAG1</i>	VIT_12s0142g00360	AT3G58780, SHP1/AGL1
	<i>VviSEP1</i>	VIT_14s0083g01050	AT5G15800, SEP1/AGL2
	<i>VviSEP3</i>	VIT_01s0010g03900	AT1G24260, SEP/AGL9
Expresión temprana	<i>VviBAM1</i>	VIT_00s1353g00010	AT5G65700, BAM1
	<i>VviEMS1</i>	VIT_16s0100g00710	AT5G07280, EMS1
	<i>VviSERK1</i>	VIT_18s0164g00070	AT1G71830, SERK1
	<i>VviDYT1</i>	VIT_12s0034g01030	AT4G21330, DYT1
Desarrollo tapetum	<i>VviMYB33</i>	VIT_13s0067g01630	AT5G06100, MYB33
	<i>MYB103</i>	VIT_19s0015g01280	AT5G56110, MYB103
	<i>VviAMS</i>	VIT_03s0038g02540	AT2G16910, AMS
Microgametogénesis	<i>VviMS1</i>	VIT_01s0011g06390	AT5G22260, MS1
	<i>VviCDKA1</i>	VIT_15s0045g00310	AT3G48750, CDC2/CDKA;1
	<i>VviFBL17</i>	VIT_07s0141g00330	AT3G54650, FBL17

Similar tendencia se aprecia en la dinámica de *VviSEP1* y *VviSEP3*, ambos genes de clase E (Figura 21. A). Los genes de clase B (*VviAP3* y *VviPI*) tienen una dinámica de acumulación de transcritos que tiende a aumentar progresivamente hasta la etapa E-L16, luego desde la etapa E-L17 disminuye considerablemente (Figura 21. B). Finalmente, el gen *VviAG*, de clase C, presenta un aumento progresivo hasta el estado E-L16, luego desciende de manera similar a los genes de clase B (Figura 21. C). Dado que *AP1* tiene la función de reprimir la expresión de *AG* (y viceversa), es esperable que los perfiles de expresión de *VviAP1* y *VviAG* se comporten de manera contraria (a medida que los genes clase A aumentan su expresión, los de clase C disminuyen). Esto puede deberse a la función de represión mutua reportada entre ambas clases de genes, aunque hacen falta análisis de expresión verticilo-específica para confirmar dicha afirmación. Por otro lado, la expresión de *VviSEP1* y *VviSEP3* se mantiene relativamente constante durante las primeras etapas evaluadas, lo que puede deberse a la capacidad de los factores de transcripción SEPALLATA de formar complejos con los diferentes factores homeóticos en todos los verticilos del meristema floral.

La expresión del gen *VFL* (el hortólogo en vid de *AtLFY*) no fue evaluada debido a que los patrones de expresión espacio-temporal previamente reportados [211] indican que su expresión es mayoritariamente durante las primeras etapas de la segunda temporada de crecimiento, es decir inmediatamente después de que se rompe la dormancia. El gen *SPL/NZZ* no

ha sido reportado en la vid y la búsqueda por identidad de secuencias no permitió identificar algún ortólogo en su genoma. El putativo ortólogo *VviEXS/EMS1* presenta los mayores niveles de expresión en muestras más tempranas (E-L12 y E-L13), descendiendo notoriamente desde E-L14 en adelante (Figura 22. A). Otros genes que codifican para receptores-quinasas involucrados en este proceso fueron identificados en la vid, de los tipos LRR-RLK, *BAM1* y *BAM2* solo se identificó un posible ortólogo para *BAM1*, denominado *VviBAM1*. *BAM1* y *BAM2* participan en el desarrollo temprano de la antera durante el establecimiento de las diferentes capas celulares en arabidopsis. *VviBAM1* mantuvo niveles similares de expresión durante E-L12 a E-L17, disminuyendo luego notoriamente en E-L18 y E-L19 (Figura 22. A).

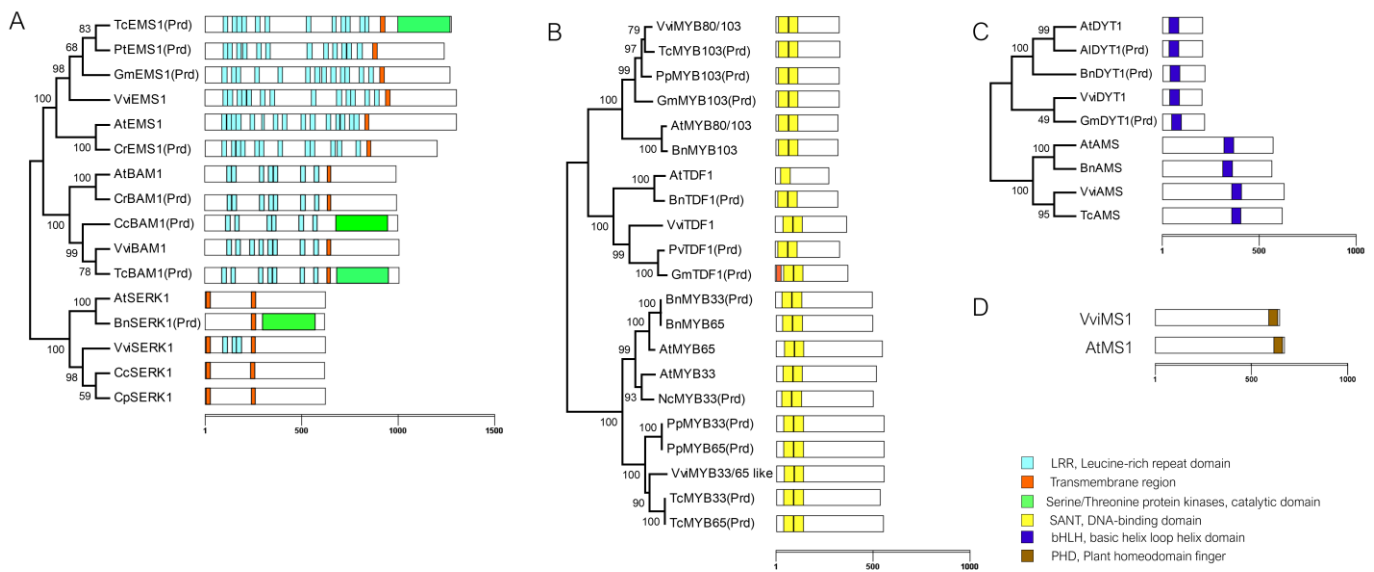


Figura 20. Relaciones filogenéticas entre los genes de estudio y genes ortólogos. Se construyeron arboles filogenéticos usando el método NJ, y un test de bootstrap con 1000 repeticiones utilizando alineamientos de secuencias de aminoácidos de longitud completa. Se indica la estructura primaria de estas proteínas junto con los dominios conservados señalados con colores. Relaciones filogenéticas entre (A) LRR-RKs, (B) R2R3MYB y (C) proteínas bHLH. En (D) se observa la estructura primaria de MS1 de arabidopsis y la vid. Tc, *T. cacao*; Cr, *Capsella rubella* Reut.; Bn, *Brassica napus* L.; Mt, *Medicago truncatula* Gaertn.; Gm, *G. max*; At, *Arabidopsis lyrata* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz; Pt, *P. trichocarpa*; Cc, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; Cp, *C. papaya*; Pp, *Prunus persica* (L.) Batsch; Pv, *Phaseolus vulgaris* L.; Prd, secuencia predicha.

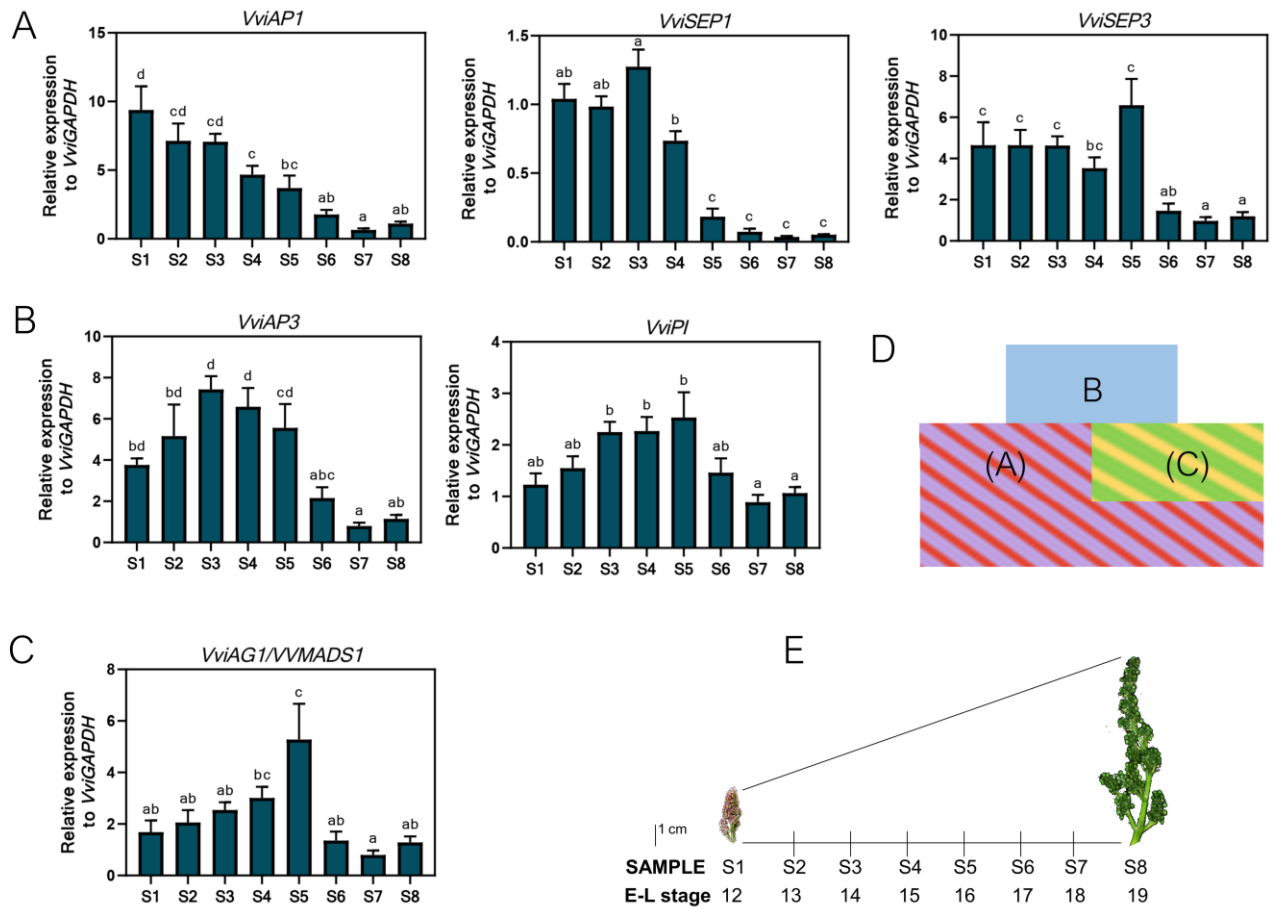


Figura 21. Expresión de genes homeóticos durante el desarrollo floral en la vid. A: Expresión relativa de genes homeóticos con función (A). B: Expresión relativa de genes con función B. C: Expresión relativa de genes con función (C). Los niveles de transcrito fueron normalizados a la expresión de *VvGAPDH*. Los bigotes representan el error estándar de la media (SEM) de cuatro replicas biológicas y tres técnicas. El eje X representa etapas del desarrollo de inflorescencias completas. Las diferencias significativas (valor p , 0.05) en la expresión entre muestras es indicada con letras diferentes (Prueba de Tukey). D: Modelo (A)B(C) para facilitar la interpretación de los resultados. E: Detalles de las muestras usadas en el análisis y su correspondiente etapa en el sistema E-L.

La dinámica de expresión de *VviBAM1* se mantiene constante durante todo el desarrollo del polen (E-L12 a E-L16), persistiendo incluso en las muestras en que se observó GPM (E-L17) (Figura 22. A). Esto sugiere que, en la vid, el establecimiento de las capas celulares de anteras es regulado de manera diferente a lo reportado en *Arabidopsis*; y que, *VviBAM1* podría estar participando en otros procesos del desarrollo floral. De todas maneras, estas afirmaciones deben ser validadas con aproximaciones experimentales. De manera similar, de los LRR-RLKs con participación temprana en el gametofito masculino *SERK1* y *SERK2*, solo se identificó un posible ortólogo para *SERK1*, denominado *VviSERK1*. Este gen presentó una mayor acumulación de transcritos en la muestra más temprana evaluada (E-L12), descendiendo gradualmente con el desarrollo hasta E-L17, para luego disminuir notoriamente en E-L18 y E-L19 (Figura 22. A). Esta dinámica no permite

proponer una función para *VviSERK1* similar a lo reportado para *SERK1* y *SERK2* en arábidopsis. La ausencia en el genoma de la vid de posibles ortólogos para *BAM2* y *SERK2* sugiere que los procesos biológicos donde participan estos receptores quinasa varían entre ambas especies.

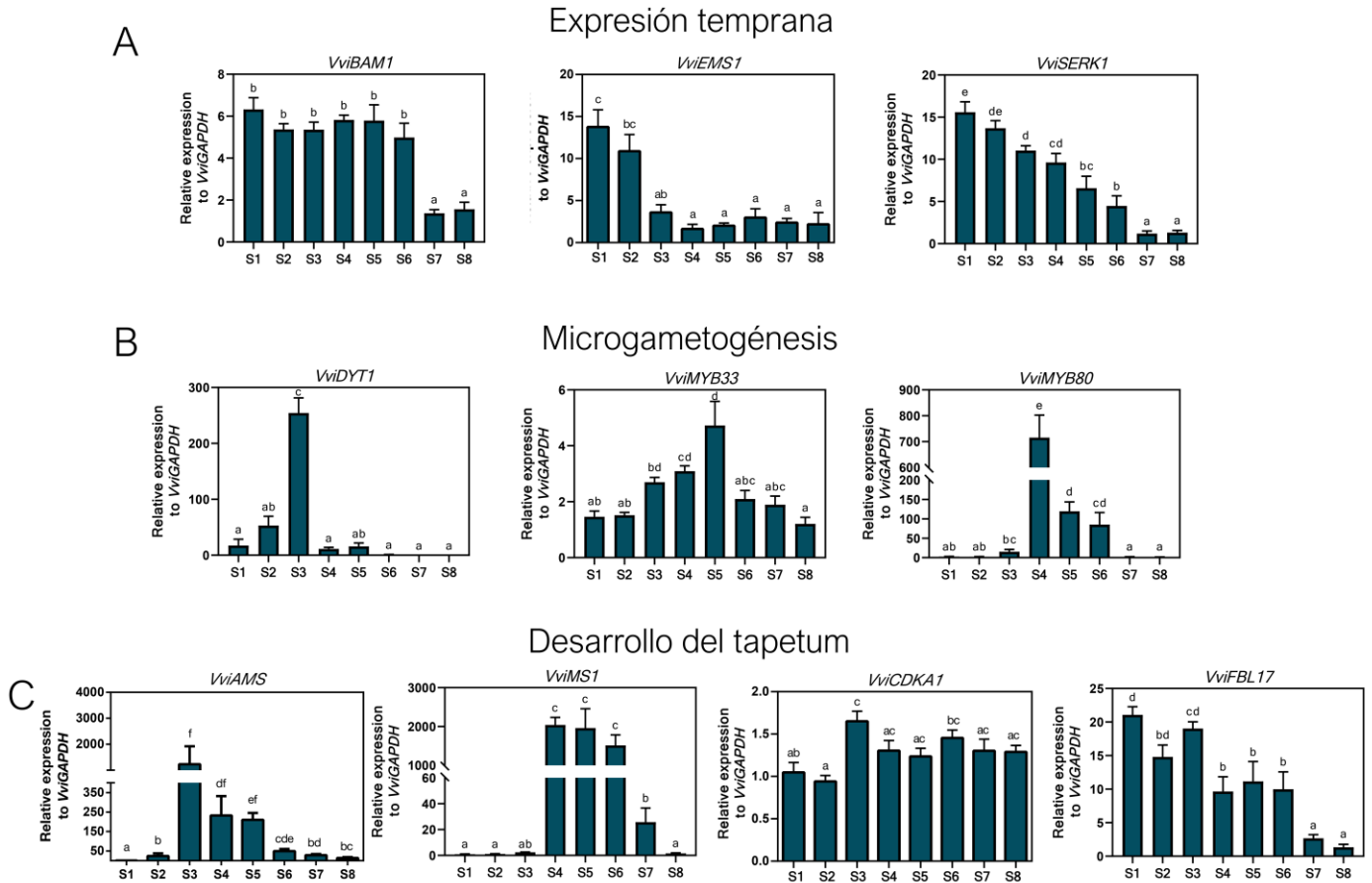


Figura 22. Expresión de genes que putativamente participan del desarrollo del polen, durante el desarrollo floral en la vid. El grupo de genes fueron agrupados en genes (A) de expresión temprana, (B) relacionados con la microgametogénesis y (C) relacionados con el desarrollo del tapetum. Los niveles de transcritos fueron normalizados a la expresión de *VviGAPDH*. Los bigotes representan el error estándar de la media (SEM) de cuatro replicas biológicas y tres técnicas. El eje X representa etapas del desarrollo de inflorescencias completas. Las diferencias significativas (valor p , 0.05) en la expresión entre muestras es indicada con letras diferentes (Prueba de Tukey).

Respecto a FT vinculados al desarrollo de anteras y polen, se identificó en la vid un posible ortólogo al gen que codifica para el FT de tipo bHLH DYT1, denominado *VviDYT1*. Este gen se expresa crecientemente desde E-L12, alcanzando el mayor nivel de acumulación de transcritos en E-L14 (Figura 22. B). Mediante microscopía, se observó que en E-L14 el contenido de anteras se encontraban como CMP y en algunos casos entrando a meiosis. La expresión de *VviDYT1* en este estado es casi

5 veces la detectada en E-L13, lo que sugiere que durante esta etapa cumple su función reguladora y se asemeja a lo observado en arábidopsis para el gen *DYT1*. *VviAMS*, otro gen que codifica para un FT tipo bHLH, concentra su expresión entre E-L14 y E-L16 con un *peak* en E-L14 (Figura 22. C). En arábidopsis, *AMS* tiene una expresión bifásica en células del tapetum, con un *peak* inicial durante la meiosis del polen y luego durante el desarrollo de la pared del mismo [212]. *VviAMS* por su parte, presenta un *peak* en el momento de la meiosis del polen para luego descender durante todo el desarrollo del polen hasta el momento en que solo se observan GPM. Esto sugiere que entre *VviAMS* y *AMS* de arábidopsis se conserva la función reguladora del desarrollo.

FTs del tipo MYB también han sido vinculados a estos procesos, por lo que se evaluó la expresión de los posibles ortólogos de *AtMYB33* y *AtMYB80*, denominados *VviMYB33* y *VviMYB80* respectivamente. En arábidopsis, la expresión de *MYB80* es prominente en anteras al finalizar la meiosis, cuando se observan tétradas de microsporas. Luego, su expresión continúa siendo detectada hasta el momento en que se inicia la degradación del tapetum, controlando genes que regulan la muerte celular programada de este tejido [213]. El ortólogo de vid *VviMYB80* ya ha sido reportado y su expresión en cultivares de uva de mesa se observa durante todas las etapas del desarrollo del polen pero con un *peak* marcado en el estado de tétradas de microsporas [214]. En este análisis, *VviMYB80* presentó expresión basal en las primeras etapas evaluadas (E-L12 a E-L14) (Figura 22. B). Luego, en E-L15 alcanzó un *peak* de expresión, que disminuyó en E-L16 y E-L17 hasta volverse imperceptible desde E-L18. En la etapa E-L15 se observó la mayor cantidad de estados del desarrollo del gametofito masculino, con células en meiosis (microesporogénesis), tétradas de microsporas, y GPM. En esta etapa, estarían ocurriendo simultáneamente los procesos de microesporogénesis y microgametogénesis de manera asincrónica en el racimo, por lo que la dinámica de expresión de *VviMYB80* sugiere que la función de este gen es conservada entre ambas especies y confirma que el estado E-L15 representa un momento clave del desarrollo del polen en la vid. *MYB33* por otro lado, presenta expresión en anteras, predominantemente en tapetum durante la meiosis del polen en arábidopsis. El análisis de expresión detectó acumulación de transcritos de *VviMYB33* en todas las etapas evaluadas, presentando los mayores niveles entre E-L14 y E-L16 con el *peak* en esta última etapa (Figura 22. B). Estos resultados señalan similitudes entre los patrones de expresión de *AtMYB33* y *VviMYB33* ya que entre E-L14 y E-L16 se observó la meiosis del polen, pero en el caso de *VviMYB33* su mayor nivel de expresión lo alcanza más tarde en comparación con *AtMYB33*.

Otro FT involucrados en el desarrollo del polen en arábidopsis es *MS1*. En la vid, se encontró una secuencia denominada *VviMS1*. La expresión de este gen en arábidopsis se detecta en etapas tempranas del desarrollo de anteras, presentando su *peak* durante la etapa de liberación de microsporas (posterior a la meiosis del polen). En el caso de *VviMS1*, la expresión en etapas tempranas es basal (de E-L12 a E-L14) y luego aumenta considerablemente entre E-L15 a E-L17 alcanzando magnitudes 200 veces mayor a los estados anteriores (Figura 22. C). Es en estas etapas donde se observó microesporogénesis y tétradas de microsporas, lo que sugiere un retardo en la expresión de *VviMS1* en comparación al

ortólogo de arábido. Este resultado puede indicar que *VviMS1* y *AtMS1* tienen funciones similares en el desarrollo del tapetum pero que además *VviMS1* podría estar participando de eventos posteriores (en base al aumento considerable de acumulación de transcritos entre E-L15 y E-L17).

Finalmente, se identificaron dos posibles ortólogos de componentes de la maquinaria del ciclo celular con participación en la división mitótica de la línea germinativa (*VviCDKA;1* y *VviFBL17* como posible ortólogo de *CDKA;1* y *FBL17* de arábido respectivamente). En arábido, el gen *CDKA;1* es expresado durante la gametogénesis masculina en las etapas de polen bicelular y tricelular. En la vid, si bien se detectó acumulación de transcritos en todas las etapas evaluadas, no fue posible determinar un patrón claro de expresión dado que *VviCDKA;1* se expresó a niveles similares en todas las muestras (Figura 22. C). Esto podría deberse a que la proteína quinasa *VviCDKA;1* participa en la regulación de otros procesos en la vid, diferentes a lo reportado en arábido. *VviFBL17* en cambio, presentó un *peak* de expresión en la etapa más temprana evaluada (E-L12), disminuyendo gradualmente con el desarrollo floral (Figura 22. C). Este gen en arábido se expresa durante la mitosis del polen, ya que *FBL17* participa marcando inhibidores de ciclinas dependientes de quinasa para su degradación, permitiendo la actividad de quinasa como *CDKA;1*. Estos resultados sugieren que al menos en la vid, este proceso no está regulado específicamente por las proteínas mencionadas, por lo que queda aún dilucidar este mecanismo en la especie de estudio.

2.4 DISCUSIÓN

El desarrollo floral y sus etapas en la vid ha sido revisado y discutido en algunos artículos [17,149,215]. Este proceso puede ser dividido en la iniciación de inflorescencias, durante la primera temporada de crecimiento y luego en la formación floral, llevada a cabo durante la segunda temporada de crecimiento. Las inflorescencias se inician en la yema latente durante el verano del primer año, continuando la formación floral luego de un periodo de dormancia. Un rasgo típico de la vid es la formación simultánea de primordios de órganos tanto vegetativos como reproductivos por el mismo ápice [17]. Durante la primavera siguiente se produce la formación floral, precedida por la activación de todas las estructuras en la yema latente. El desarrollo sucesivo de órganos florales es simultáneo y asincrónico en cada flor de la inflorescencia, con un orden de aparición de órganos similar al común de las angiospermas. En primer lugar, aparecen cinco sépalos componiendo el cáliz y luego cinco pétalos formando la corola, seguido de cinco estambres y dos carpelos que constituyen el androceo y gineceo respectivamente [216]. Durante su crecimiento, los pétalos cubren los sépalos que se degeneran y se unen en su parte superior para formar el sombrero o capuchón que protegerá los órganos reproductivos. El capuchón se desprende en la etapa de anthesis como consecuencia de la elongación del filamento de estambres [149].

Debido a la complejidad de la inflorescencia y la formación de flores en la vid, algunos autores han descrito fases sucesivas para proporcionar una escala del desarrollo reproductivo. Lorenz & colaboradores [200] y Coombe [201]

resumieron el desarrollo reproductivo en etapas sucesivas codificadas por números del 0 al 47 según las características de la inflorescencia externa. Parte de este desarrollo es descrito en [215], contrastado con las etapas E-L. Luego de que la yema brota en primavera, la hoja que acompaña la inflorescencia se expande en E-L09 y la inflorescencia ya es distinguible en la yema a partir de E-L12 y se separa totalmente del brote anual en la etapa E-L15. Las flores en esta etapa se observan en *clusters*, que se separan progresivamente por elongación del pedúnculo floral. Las inflorescencias del cultivar 'Carmenere' en E-L12 miden en promedio 1 cm, con flores agrupadas en pequeños *clusters* que hacen difícil la disección de flores individuales. Debido a limitaciones técnicas no fue posible observar el contenido de anteras, las que presentan forma redondeada en esta etapa (Basado en observaciones al microscopio estereoscópico). Es probable que esto se deba a que la antera se encuentra en un estado temprano del desarrollo compuesta por tejido esporofítico. Lebon y colaboradores [217] observaron mediante microscopía secciones de anteras en los cultivares 'Gewurztraminer' (GW) y 'Pinot Noir' (PN) en distintos estados del desarrollo. En la etapa E-L12 identificaron células esporógenas en las anteras de ambos cultivares, al igual que lo propuesto en este trabajo para el cultivar 'Carmenere'. En la etapa E-L21 es cuando comúnmente ocurre la antesis, que continúa durante una semana aproximadamente. Las etapas posteriores se determinan en base a la pérdida del capuchón, marcándose las etapas E-L23 como floración completa o *full bloom* (cuando el 50% de los capuchones florales han caído de la inflorescencia) y E-L25 cuando esta variable alcanza el 80%. Desde E-L27 en adelante se describen diferentes etapas del desarrollo frutal a partir de los óvulos fertilizados. Como se indica, estos marcadores morfológicos no dan cuenta con precisión del desarrollo interno de órganos reproductivos, los que podrían variar entre cultivares [218,219] o verse afectados por fluctuaciones de factores ambientales (como luz y temperatura) en momentos claves del proceso [220]. Esto quiere decir que la cinética del desarrollo reproductivo masculino es dependiente del cultivar y no necesariamente sincrónica con la escala del desarrollo E-L. Ejemplo de esto se reporta en [219], quienes observaron que la ontogénesis de los órganos masculinos y femeninos no es sincrónica entre plantas de cultivares GW y PN cultivadas en el mismo viñedo. Tanto la meiosis masculina como femenina ocurren aproximadamente una semana antes en PN que en GW. En PN, la meiosis ocurre entre E-L12 y E-L15 en anteras [215,219]. Las observaciones en 'Carmenere' posicionan este proceso entre E-L13 y E-L16, lo que sugiere un desfase del desarrollo reproductivo entre ambos cultivares. Los factores ambientales y sus fluctuaciones en los distintos lugares de cultivo podrían también colaborar con las diferencias observadas, por lo que más estudios son necesarios para confirmar esto (que no fueron parte de este trabajo de tesis por escaparse del foco del estudio). Por su parte, la variable vegetativa "número de hojas abiertas en el brote" en 'Carmenere' presentó también diferencias con lo reportado en PN [201], las que pueden ser explicadas, como se indicó anteriormente, por las diferencias entre cultivares y variaciones en los factores ambientales específicos de los lugares de cultivo.

2.4.1 Predecir eventos claves de la floración utilizando modelos fenológicos

El estudio de los ciclos de vida (o fenología) y su conexión con el clima, juega un papel destacado en los modelos agrícolas y de simulación de ecosistemas locales, regionales y globales [221]. Conocer la sincronización anual de las etapas del desarrollo con los factores ambientales y su variabilidad puede ayudar a la toma de decisiones en el manejo de cultivos siendo la base para mejorar el tiempo de aplicación de plaguicidas, así como la fertilización, el riego y las operaciones de cosecha [222]. En viticultura, los modelos fenológicos han sido exitosos para una variedad de aplicaciones, como la planificación más eficiente de la cosecha y las prácticas vitícolas [223], la predicción de la vulnerabilidad a los ataques de plagas y la selección de cultivares en nuevas áreas de cultivo [221]. Además, combinados con escenarios de cambio climático han permitido proyectar el impacto de este sobre la fenología de la vid [224]. Entre los modelos disponibles, algunos permiten predecir un número limitado de etapas de crecimiento como brotación [225], floración o envero [226], mientras que otros permiten predecir todo el desarrollo fenológico de la vid (desde brotación hasta cosecha) [227-229]. Por una parte existen modelos fenológicos específicos para predecir un número limitado de etapas de crecimiento de la planta, como brote, floración o envero [225,226], mientras que otros se desarrollaron para predecir todo el desarrollo fenológico de la vid (desde la brotación hasta la cosecha), siendo importantes para la aplicación de pesticidas durante el crecimiento vegetativo o el inicio de la floración [227-229]. En ambos enfoques, se utilizan las escalas fenológicas (como el sistema E-L) para desarrollar modelos matemáticos que incorporan la fenología como variable cuantitativa. Sin embargo, ninguno de estos modelos ha sido utilizado para predecir eventos del desarrollo interno de la flor como la meiosis del polen, teniendo en cuenta que la meiosis es un punto clave en la reproducción sexual. Las anteras muestran una sensibilidad particular en esta etapa a varios tipos de estrés, especialmente aquellos que conducen a cualquier forma de privación de carbohidratos [215], por lo que predecir el momento en que ocurre este evento podría aportar en la planificación de las prácticas vitícolas. Los resultados obtenidos en el cultivar 'Carmenere' podrían colaborar a enriquecer dichos modelos fenológicos mediante la coordinación de los eventos observados por microscopía, las escalas fenológicas disponibles y variaciones de factores ambientales.

2.4.2 Regulación del desarrollo reproductivo en la vid

El análisis de la red molecular que controla las diferentes etapas del desarrollo reproductivo en la vid se ha basado en la identificación y análisis funcional de genes ortólogos de los correspondientes genes de *Arabidopsis* [17,44]. Mediante esta estrategia, un grupo de genes ha sido aislado y relacionado con procesos específicos o etapas del desarrollo reproductivo sobre la base de su expresión génica sitio-temporal específica. Sin embargo, la información sobre su función biológica en la vid es aún escasa. Además, no hay evidencia de que las vías reguladoras de la floración conocidas en crucíferas y especies de cereales sean compartidas con la vid. Sin embargo, los genes homólogos de *Arabidopsis* o genes de cereales implicados en esas vías se pueden encontrar en el genoma de la vid.

Con respecto a los integradores de señales de floración, tres miembros putativos de la subfamilia SOC1/AGL20 de factores de transcripción MADS-box [230] están presentes en el genoma de la vid [1]. Uno de ellos, *VvMADS8*, ha sido caracterizado con más detalle [38]. La expresión de *VvMADS8* es mayor durante las etapas más tempranas del desarrollo de la inflorescencia y disminuye en las etapas posteriores del desarrollo de la flor. Además, no se detecta en flores y frutos maduros, aunque se expresa ligeramente durante el desarrollo del zarcillo. También se han caracterizado genes homólogos al que codifica para el integrador de señales de floración FT de *Arabidopsis* [38,231]. En el genoma de la vid existen seis genes que podrían pertenecer a la familia de genes FT/TFL1 y cinco de ellos han sido caracterizados [232]. Entre ellos, la expresión de *VvFT* (el ortólogo de FT más probable) se asocia con la inducción floral estacional en yemas latentes y con el desarrollo de inflorescencias, flores y frutos. Ninguno de los genes integradores de señales de floración fue evaluado en el cultivar 'Carmenere', dado que su función temprana se escapa del foco de estudio.

También, se han caracterizado en la vid los homólogos de los genes de identidad del meristema floral *AP1* y *FRUITFULL* (*FUL*) de *Arabidopsis* con los nombres de *VAP1* y *VFUL-L* [233]. *VFUL-L* y *VAP1* se expresan muy temprano en el *anlage* y mantienen su expresión en los órganos derivados desde este meristema (que pueden ser zarcillos o inflorescencias). *AP1* se identificó inicialmente como un gen de clase A involucrado en la identidad de sépalos y pétalos [32,234], y se demostró que *FUL* juega un papel en el desarrollo de carpelos y frutos [235]. Al igual que sus homólogos de *Arabidopsis*, *VAP1* y *VFUL-L* se expresan a lo largo del desarrollo de las flores, lo que sugiere que podrían desempeñar un papel en la especificación de la identidad de los órganos florales. En el cultivar 'Carmenere', el gen *VAP1* presentó una dinámica descendente con el mayor nivel de acumulación de transcritos en las etapas más tempranas evaluadas (Figura 21. A). No se determinó la expresión de *VFUL-L* debido a que, basados en la literatura disponible, este gen participa en las etapas iniciales del desarrollo floral, pero no participaría del desarrollo de anteras y polen.

En esta línea, también se han caracterizado genes de identidad de órganos de flores en la vid. Todos pertenecen a la familia de factores de transcripción MADS-box y son homólogos de los genes de función B y (C) (o de función B, C, y D y E en base al modelo anterior). En la vid, tres homólogos de genes de función B se han caracterizado como *VvMADS9* (*VvPI*), *VvAP3* y *VvTM6* [45,236] y podrían representar a todos los miembros de esta subfamilia. La expresión de los tres genes se detecta en pétalos y estambres. *VvTM6* se expresa más ampliamente en los órganos reproductores y también se ha detectado en carpelos, frutos y semillas. Según lo propuesto por Poupin et al. [45], la expresión diferencial entre *VvAP3* y *VvTM6* sugiere una posible subfuncionalización de este gen homeótico (*AP3*) en la vid. Huang y colaboradores [237] identificaron en pak-choi (*B. rapa* ssp. *chinensis*) el gen *BcAP3*, que codifica para una proteína con dominio MADS-box, putativo ortólogo de *AP3* de *Arabidopsis*. La transcripción de *BcAP3* solo se detectó en flores, lo que sugiere su participación en el desarrollo floral. La sobreexpresión de *BcAP3* en *Arabidopsis* resultó en anomalías del desarrollo de anteras y polen, provocando esterilidad masculina. En el cultivar 'Carmenere', la expresión de *VvAP3* se detectó durante el desarrollo floral

con niveles de expresión similares hasta E-L16, cuando presenta una tendencia a disminuir (aun cuando estas diferencias no sean estadísticamente significativas) (Figura 21. B). El momento en que esta tendencia se observa concuerda con la etapa en que concluye la meiosis del polen, lo que sugiere que *VviAP3* podría ser parte de la red regulatoria de este proceso. Sin embargo, hace falta una mayor caracterización de este gen y su función en el desarrollo floral de la vid.

Aunque tienen diferentes funciones en la determinación de la identidad floral, los genes de función (C) (o función C + función D + función E), forman un clado de MADS-box monofilético conocido como la subfamilia AG. De estos, se han reportado dos putativos ortólogos en vid. *VvMADS1*, (renombrado *VviAG1*) presenta la mayor identidad de secuencia comparado con *SHPI/2* y se expresa en los dos verticilos florales internos durante el desarrollo floral y durante el desarrollo de la baya [49,238]. *VviAG2* también pertenece a esta subfamilia y los análisis de expresión en el cultivar 'Pinot noir' indicaron una acumulación de transcritos relativamente alta en las primeras muestras evaluadas en ese trabajo (14 y 11 días pre-antesis), específicamente en anteras y filamentos [210]. En el cultivar 'Carmenere', se evaluó la expresión de *VviMADS1/AG1* presentando una dinámica creciente (con un *peak* en E-L16), para luego decrecer en las etapas posteriores evaluadas (Figura 21. C). Esta dinámica muestra una tendencia similar a lo reportado por [210], considerando que las muestras evaluadas en ese artículo representan un rango del desarrollo menor en comparación al evaluado en este trabajo. Sin embargo, es necesario determinar la expresión órgano específica de *VviMADS1/AG1* durante el desarrollo para avanzar en la comprensión de su participación específica en el desarrollo reproductivo en el cultivar 'Carmenere'.

Finalmente, hasta ahora se han caracterizado dos genes *VvMADS2* y *VvMADS4* y presentan putativa homología con *SEP1* y *SEP3*, respectivamente [50]. *VvMADS2* se expresa temprano durante el desarrollo de la inflorescencia hasta la antesis y pueden detectarse en los tres verticilos internos de la flor. Una dinámica de expresión similar se reportó para *VvMADS4* en [50], la que además se detecta durante el desarrollo del fruto. En Palumbo y colaboradores [210] evaluaron también la expresión de ambos genes, reportando que *VviSEP1* se expresa en todos los verticilos mayoritariamente durante las primeras etapas evaluadas (14 y 11 días pre-antesis) y se vuelve indetectable después de ocurrida la fecundación. El gen *VviSEP3*, presenta un patrón menos claro durante el desarrollo floral destacando su expresión post-antesis en ovarios y embrión (Figura 21. A), lo que concuerda con la observación previa realizada por Boss y colaboradores sobre este gen (*VvMADS4* en [50]).

Del grupo de 10 genes estudiados que putativamente participan en el desarrollo específico de anteras y polen conocidos en arabidopsis, 3 de ellos (*SERK1/2*, *MYB80* y *CDKA;1*) han sido previamente caracterizados en la vid, siendo vinculados a diferentes procesos. De estos, solo *VvMYB80* fue relacionado al desarrollo de anteras [214], mientras que los genes *VvSERK* (*VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3*) fueron vinculados a la embriogénesis somática de la vid [239] y el gen *VviCDKA;1* fue estudiado en el contexto de la regulación de la endodormancia regulada por ABA [240]. Por lo tanto, este trabajo es el primer reporte de la expresión relativa de los genes *VviBAM1*, *VviEXS/EMS1*, *VviTPD1*, *VviDYT1*, *VviMYB33*, *VviAMS*, *VviMS1*,

VviFBL17, *VvSERK1* y *VviCDKA;1* en el contexto del desarrollo reproductivo de la vid. Sin embargo, como se indicó anteriormente, son necesarios mayores análisis para comprobar la hipótesis de conservación de la función biológica de estos genes ortólogos entre *Arabidopsis* y la vid. El sistema modelo vegetal elegido por excelencia para el estudio de la regulación molecular del desarrollo reproductivo es *Arabidopsis*. El conocimiento obtenido de este modelo ha sido transferible, en muchos casos, a cultivos como plantas herbáceas, anuales y facultativas de día largo [241]. Sin embargo, muchos cultivos hortícolas (incluyendo a la vid), son plantas perennes leñosas que no necesariamente responden de manera similar a los estímulos de floración internos y externos con respecto a *Arabidopsis*. De hecho, el proceso de floración es bastante diferente entre estas especies. Por lo tanto, para comprender y luego controlar la floración de la vid (y con eso el desarrollo de las bayas) se deben adaptar los modelos de floración generados con el trabajo realizado en *Arabidopsis* mediante la identificación de las diferencias entre este modelo y la vid.

Si bien el objetivo de este trabajo no era la caracterización de los genes evaluados, representa un marco para investigación futura de aquellos genes que aún no han sido estudiados en la vid y genera la oportunidad de comprender los mecanismos de regulación del desarrollo del polen con elementos específicos de esta especie. Por otra parte, la aproximación molecular permitió complementar las observaciones realizadas por microscopía de manera que las etapas E-L propuestas para los análisis posteriores correspondan al momento en que los eventos del desarrollo del polen están ocurriendo.

Capítulo III: Análisis de expresión de genes *VviZFPs* candidatos

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 Regulación transcripcional de C2H2-ZFPs en el desarrollo floral con énfasis en el desarrollo de anteras y polen

Hasta ahora, se han reportado muy pocos ejemplos de acción combinatoria entre diferentes FTs en el contexto del desarrollo de las anteras, incluyendo algunos miembros de la familia C2H2-ZFP. Con el advenimiento de nuevas herramientas y técnicas para el análisis de la función genética, se pueden revelar nuevos elementos reguladores de esta vía, cubriendo en parte esta brecha de conocimiento. Además de identificar los factores de transcripción específicos de anteras, es necesario identificar los sitios de unión en *cis* donde estos factores se unen preferentemente. La información disponible sobre los sitios de unión en *cis* de los factores de transcripción específicos de anteras identificados es escasa a la fecha [242].

Desde que se clonó el primer C2H2-ZFP en 1992 [243], la investigación se ha dirigido en comprender la participación de esta familia de proteínas en diferentes procesos fisiológicos y del desarrollo vegetal. Sin embargo, la relación de estas proteínas con la regulación de la maduración de órganos florales (como anteras y polen) ha sido menos estudiada en comparación con la regulación de la inducción de la floración. Las C2H2-ZFP afectan el desarrollo de flores, actuando en etapas tempranas del desarrollo, sobre el primordio de órganos florales. El gen *SUP* codifica para un FT represor con un dominio de unión al ADN C2H2-ZF y un dominio de represión EAR [73,244,245]. En *Arabidopsis*, *SUP* controla los primordios del estambre, los primordios del carpelo y los óvulos durante el desarrollo de la flor [246-248]. *SUP* se requiere específicamente para equilibrar la proliferación celular y crear un límite entre el verticilo 3 y 4, reprimiendo la expresión de los reguladores de función B (*AP3* y *PI*) y modulando procesos regulados por auxinas y citoquininas [246,249]. *SUP* actúa como represor activo de la biosíntesis de auxina reclutando al componente del grupo *Polycomb* (PcG) *CURLY LEAF* (*CLF*) para reprimir los genes de biosíntesis de auxina *YUCCA1* y *YUCCA4* (*YUC1/4*) [250]. En el mutante *sup*, la actividad ectópica de auxina retrasa el evento de terminación del MF, lo que conduce a un tamaño anormalmente grande de este meristema [250]. Otros genes *C2H2-ZFP SUPERMAN-like* como *RBE* [251] y *JAD* [252] han sido relacionados con la formación del primordio de pétalos. A su vez, *JAG* junto con su parálogo *NUBBIN* (*NUB*) promueven la diferenciación de carpelos y estambres. *JAG* y *NUB* actúan de forma redundante para promover el crecimiento de microsporangios (o sacos polínicos) y de las paredes del carpelo que encierran los óvulos (en el gineceo). Además, *JAG* y *NUB* promueven la diferenciación celular en la pared adaxial del carpelo y regulan el número de capas celulares que componen ese tejido [253]. El desarrollo de pétalos implica polaridad divergente con tasas de crecimiento mediante la regulación por auxinas [254]. Esto ha llevado a postular que *JAG* regula la tasa de crecimiento de pétalos mediante la regulación de las auxinas [254]. *JAG* puede inhibir

directamente la expresión de *PETAL LOSS (PTL)*, que codifica para un FT que actúa en la parte superior de la red regulatoria de auxina que inician el desarrollo de los pétalos. Además, *JAG* es un gen blanco directo de AG.

Más específicamente en el contexto del desarrollo de anteras y polen se han identificado y caracterizado algunos C2H2-ZFP con funciones importantes [58]. En petunia, se han reportado siete genes *ZFP (PhZPT)* de la familia EPF secuencialmente expresados a lo largo del desarrollo de anteras (Figura 23) [68]. La expresión más temprana, del gen *PETHy;ZPT3-2*, renombrado *TAPETUM DEVELOPMENT ZINC FINGER PROTEIN1 (TAZ1)*, se localiza en el tapetum después de la meiosis de CMP. El silenciamiento de la expresión de *TAZ1* conduce al desarrollo aberrante y degeneración prematura del tapetum, provocando el aborto de las microsporas y una producción limitada de granos de polen [255]. Se ha señalado a *TAZ1* como componente de MS1, participando posiblemente en el desarrollo del tapetum y regulación de la fertilidad del polen [255]. El segundo gen identificado, *PETHy;ZPT2-5*, renombrado como *MEIOSIS-ASSOCIATED ZINC-FINGER PROTEIN1 (MEZ1)*, se expresa específicamente en CMPs durante las primeras etapas del desarrollo de anteras y luego en tejidos vegetativos. *MEZ1* actúa sobre el proceso meiótico, por lo que el silenciamiento provoca anomalías en la meiosis generando meiocitos con contenido anormal de ADN [114]. El papel de los otros genes EPF como *PETHy;ZPT2-10*, y *PETHy;ZPT3-3* en este proceso no ha sido estudiado, sin embargo, sus patrones de expresión sugieren un papel en el desarrollo de polen y pistilos [67,112].

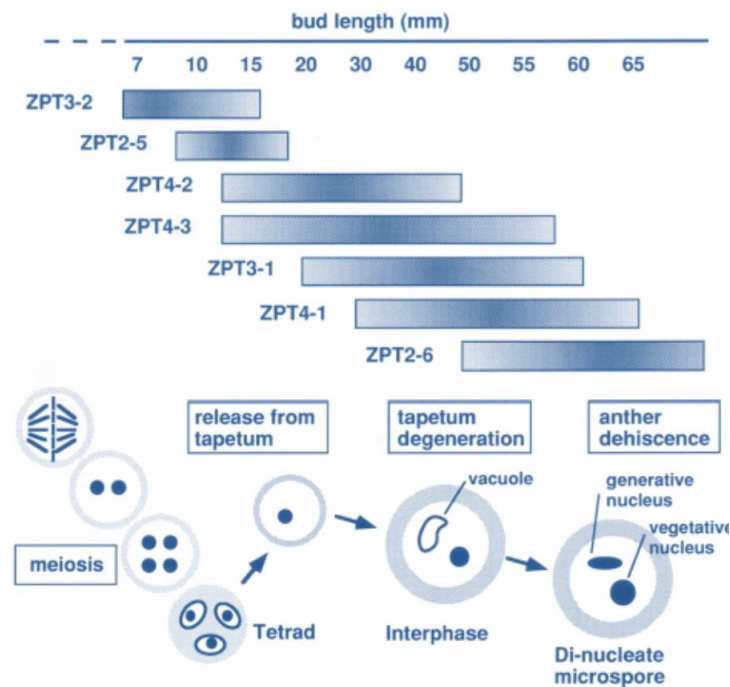


Figura 23 (Página anterior). Patrones temporales de expresión de los genes EPF en anteras y filamentos. Las etapas de desarrollo están estandarizadas por referencia a la longitud de las yemas (*bud length*). Las barras en la parte superior indican patrones temporales de la expresión de (Continuación página anterior) los genes de EPF respectivos, con gradientes en la intensidad de color de las barras que representan los niveles de expresión relativos. Las etapas de desarrollo de las anteras y el polen correspondientes a las respectivas longitudes de las yemas se muestran en la parte inferior. Extraído de [69].

En arábido es interesante el papel de DUO1, un factor de transcripción MYB específico de la línea germinal que participa en el desarrollo de microsporas activando los genes *DAZ1* y *DAZ2*; ambos codifican para C2H2-ZFP del tipo Q. Estos genes de función redundante promueven la división de células germinales regulando la acumulación de ciclinas mitóticas CYCB1;1, las que promueven la transición de fase G2 a M [77]. *DAZ1* y *DAZ2* son dos genes necesarios para la división-diferenciación de células germinales, y para la fusión de gametos durante la fertilización. En el modelo propuesto [77], promueven la división y diferenciación celular al reprimir un represor de ambos procesos desconocido, por un mecanismo dependiente del motivo EAR.

Otro gen C2H2-ZFP recientemente aislado y caracterizado en arábido es *MALE FERTILITY-ASSOCIATED ZINC FINGER PROTEIN1 (MAZ1)* [256]. *MAZ1* presenta un patrón de expresión preferencial en el desarrollo temprano de la antera. En líneas mutantes para *MAZ1* se ven alterados los patrones de deposición de las capas de la pared de microsporas en desarrollo, afectando irremediablemente este proceso. Estos defectos conducen a una reducción de la fertilidad y al aborto del polen, lo que revela el rol esencial de *MAZ1* en el desarrollo del polen. En *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*, el gen *BcMF20*, homólogo del gen arábido *thaliana At1g26610*, se expresa específicamente durante el desarrollo de granos de polen y tapetum, pero se desconoce la asignación de su función específica [111].

Estos antecedentes en su conjunto permiten contextualizar el rol descrito hasta la fecha para las C2H2-ZFP en el desarrollo de anteras y polen. Dado que en el capítulo I de este trabajo de tesis se identificó un grupo de genes *VviZFP* interesantes de estudiar y que en el capítulo II se logró determinar el momento en que el desarrollo del polen ocurre, queda determinar en este capítulo, la expresión de estos genes durante el desarrollo del polen.

Objetivo específico a desarrollar:

3. Establecer los perfiles de expresión espacio-temporal de los genes *VviZFP* candidatos durante las diferentes etapas del desarrollo de flores de *Vitis vinifera*.

Se proponen análisis de qRT-PCR de genes candidatos para determinar la dinámica en los niveles de expresión relativa durante el desarrollo floral. Por otro lado, mediante la generación de líneas transgénicas de *Nicotiana benthamiana promVviZFP::GUS* se busca determinar la especificidad de tejido en la expresión de los genes candidatos.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Análisis de expresión cuantitativa de los genes en estudio (qRT-PCR)

El grupo de muestras utilizadas para el análisis representa un momento del desarrollo floral que considera el desarrollo del polen en la vid. El material vegetal fue descrito previamente en 2.2.1 y la obtención del set de ADNc se describe en 2.2.6. La expresión génica se cuantificó mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR). Se consideraron cuatro repeticiones biológicas (correspondiente a las extracciones independientes) y tres repeticiones técnicas por cada una de estas, de acuerdo a la metodología descrita por [41]. Las reacciones se realizaron en un termociclador *Mx3000P qPCR System* de Agilent y en todas las reacciones se utilizó el kit *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* de Thermo Scientific de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Para esto, se consideró un volumen de 2 μ l de *Master Mix*, 250 nM de cada partidor, 50 ng de cDNA y agua libre de nucleasas hasta un volumen de reacción final de 20 μ l. La amplificación fue seguida de una curva de desnaturalización generada desde 65 $^{\circ}$ C a 95 $^{\circ}$ C. Para determinar la expresión relativa se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ [207] y para la normalización se utilizó el gen *VviGADPH* (Locus: VIT_217s0000g10430) como gen con expresión constitutiva, probado previamente en el laboratorio. El diseño de partidores se realizó siguiendo la metodología descrita en 2.2.7 y el detalle de los oligonucleótidos utilizados se describen en Tabla 7.

Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la determinación de la expresión relativa de los genes en estudio mediante qRT-PCR

Secuencia	Nombre partidor	Partidor	Secuencia (de 5' a 3')	Tm ($^{\circ}$ C)
VviZFP1	qpcrVviZFP1_F	Forward	TTAGGTGGTCATAAGAAGTCCC	56.9
	qpcrVviZFP1_R	Reverse	GCAACTCATGATAGCTGCTA	55.3
VviZFP3	qpcrVviZFP3_F	Forward	ATCGGTCCTCCAAATGCCTG	60.1
	qpcrVviZFP3_R	Reverse	CTTCAACGGGATCACCACCA	59.9
VviZFP13	qpcrVviZFP13_F	Forward	TCGCACCAGGCTCTAGG	57.9
	qpcrVviZFP13_R	Reverse	TGCCCACTCTCTATCC	57.9
VviZFP30	qpcrVviZFP30_F	Forward	GGAGTCGATGAGGTTGAGGC	60.2
	qpcrVviZFP30_R	Reverse	CCCAGCGCTTGAATGAAGG	59.8
VviZFP68	qpcrVviZFP68_F	Forward	GCAGTCCCGTCGTTCC	58
	qpcrVviZFP68_R	Reverse	GAGCATTGCGGGTCTTGG	58.5
VviZFP81	qpcrVviZFP81_F	Forward	ATGCCAGTCTGCTTCC	56.4
	qpcrVviZFP81_R	Reverse	GCTGAGCCTGAGATGTGG	57.5
VviZFP85	qpcrVviZFP85_F	Forward	ACAAGCAGTGGGCTGTGAG	59.9
	qpcrVviZFP85_R	Reverse	AGAGGCAGTTCGAGACAAGC	60

3.2.2 Generación de líneas transgénicas *promVviZFP::GUS* en plantas de *Nicotiana benthamiana* Domin

3.2.2.1 Diseño y almacenamiento de partidores

Se diseñaron partidores para amplificar las regiones promotoras de *VviZFP13* y *VviZFP68* (2000 pb río arriba desde el codón de inicio de la traducción) desde DNA genómico de hoja del cultivar 'Carmenere' obtenido previamente en el laboratorio. La secuencia se diseñó manualmente, de entre 18 a 35 bases de longitud, con valores de Tm entre 50 y 65°C y una G o C en el extremo 3' en caso de ser posible. Se diseñaron también, partidores desde la zona media de la secuencia para verificar el tamaño del fragmento por PCR y validar las secuenciaciones. Además, se realizó un mapa de digestión (Figura Suplementaria 3 y Figura Suplementaria 4) de ambas secuencias con NEBcutter V2.0 [257] para adicionar un sitio de corte de alguna enzima de restricción que no posea la secuencia a cada partidor (y generar un producto de PCR con el promotor flanqueado por sitios de restricción). La lista de partidores utilizados se detalla en tabla 8. Las diluciones y condiciones de almacenamiento fueron descritas en el punto 2.2.7 de este trabajo de tesis.

Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para clonación de la región promotora de los genes *VviZFP68* y *VviZFP13*. En negrita la secuencia correspondiente al sitio de restricción.

Nombre partidor	Partidor	Secuencia (de 5' a 3')	Tm (°C)	Enzima de restricción
promVviZFP13_F	Forward	C GGATCC TGGACTTTTAGGAAGCCTTAAG	64.9	BamHI
promVviZFP13_R	Reverse	G AGATCT CACTTTACGCAGAGGAAAATCC	63.6	BglII
promVviZFP13_central_F	Forward	GTACCAAAAGTTGGGGTTATATAAAGAGTG	60.2	
promVviZFP13_central_R	Reverse	ACTTTAAAACACGTCTTTAAGATTAAG	59.8	
promVviZFP68_F	Forward	C AAGCTT GTTAACTCGATCAACTTAAGTTTA	61.4	HindIII
promVviZFP68_R	Reverse	GGATCC GGGATATGTCTGTTGGGAG	64.6	BamHI
promVviZFP68_central_F	Forward	GTAATATAATATTCTTGTAGTCATACGGGATTGC	61.2	
promVviZFP68_central_R	Reverse	GCAATCCCGTATGACTACAAGAATATTATTTAC	61.2	

3.2.2.2 Amplificación y clonamiento de las regiones promotoras

Las regiones promotoras de *VviZFP13* y *VviZFP68* fueron amplificadas desde ADN genómico aislado de hojas jóvenes del cultivar 'Carmenere' mediante PCR, utilizando la enzima *Taq DNA Polimerasa Platinum® High Fidelity* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con los pares de partidores descritos en Tabla 8. En cada reacción de PCR se empleó: 50 - 100 ng de ADN_g como templado, 1,5 mM de MgCl₂, 1 X de Buffer PCR, 250 nM de cada partidor, 200 nM dNTPs y 0,25 U de *Taq DNA* polimerasa. El perfil de temperaturas de cada PCR consistió de: 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 45 s, 58-60°C por 60 s, 72°C por 60-90 s y una extensión final de 72°C por 7 min. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v en buffer TBE 1X. Las bandas de interés fueron aisladas desde el gel y purificadas usando el sistema

EZNA Gel extraction kit (Omega Bio-Tek), para luego ser ligadas al vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA). Los productos de la ligación fueron introducidos en células quimio-competentes de *Escherichia coli* DH5 α y las colonias positivas fueron seleccionadas en medio de selección en base a su coloración (0,15 mM de IPTG, 30 μ g/ml de X-Gal) y a la resistencia a ampicilina (100 μ g/ml). El ADN plasmidial de colonias positivas fue purificado (ver 3.2.2.3) para determinar luego la secuencia de los plásmidos recombinantes mediante secuenciación. El servicio de secuenciación fue llevado a cabo por MACROGEN Inc. (Seúl, Corea del sur) y el análisis de las secuencias se llevó a cabo en el programa VectorNTI versión 11.5.4 [258].

Las colonias positivas (validadas por PCR) fueron inoculadas en 5 ml de medio LB líquido más el respectivo antibiótico de selección e incubadas a 37 °C en agitación por 12-16 hr. Posteriormente, se purificó el ADN plasmidial utilizando el kit *EZNA Plasmid Mini Kit* (Omega Bio-Tek) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. El vector de expresión binario pBI121, por ser un plásmido de bajo número de copias en bacterias, se purificó a partir de 100 ml de cultivo en medio LB (con 50 mg/L de kanamicina).

3.2.2.4 Generación de construcciones genéticas para transformación estable

Una vez secuenciadas, las regiones promotoras de los genes *VviZFP13* y *VviZFP68* fueron liberadas desde el vector pGEM-T por digestión enzimática e insertados en orientación entre los sitios BamHI - BglII del vector binario pCAMBIA1303 para el promotor de *VviZFP13*, mientras que el promotor de *VviZFP68* fue insertado en orientación entre los sitios HindIII - BamHI del vector binario pBI121. En ambas construcciones, se reemplazó el promotor CAMV 35S por el promotor correspondiente de cada gen, regulando de esta manera la expresión del gen de la β -glucuronidasa (GUS) (Figura Suplementaria 5 y Figura Suplementaria 6). Las construcciones generadas se denominaron *promVviZFP13::GUS* y *promVviZFP68::GUS*.

3.2.2.5 Preparación del material vegetal

Semillas de *N. benthamiana* WT fueron lavadas tres veces con etanol al 70% v/v por 2 minutos y luego una vez con hipoclorito de sodio 2% v/v por 20 minutos. Posteriormente, se realizaron de 5 a 8 enjuagues con agua destilada estéril y se sembraron en placas Petri con medio MS 1 fuerza (4,4g/L Medio Murashige and Skoog (MS); 20g/L Sacarosa; 5 mM MES-KOH, pH 5.8; 0,5% PhytoAgar). Las placas se llevaron a cámara de crecimiento bajo un régimen de luz de 18 h (intensidad de luz aproximada de 140 μ mol/m²/s) a 24-28 °C hasta germinadas las semillas. Las plántulas fueron individualizadas en envases de cultivo GA-7 de Magenta con MS fresco y mantenidas en las mismas condiciones descritas hasta la transformación.

3.2.2.6 Obtención de plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana*

Los vectores binarios pCAMBIA1303 y pBI121 conteniendo las construcciones *promVviZFP13::GUS* y *promVviZFP68::GUS* respectivamente fueron introducidas mediante electroporación en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Las bacterias transformadas fueron cultivadas y seleccionadas en medio YM sólido (0,04% p/v de extracto de levadura, 1% p/v manitol, 1,7 mM NaCl, 0,8 mM MgSO₄·7H₂O, 2,2 mM K₂HPO₄ y 1,5% p/v de agar) con los siguientes antibióticos: 100 mg/L rifampicina, 25 mg/L gentamicina y 50 mg/L kanamicina (Siendo kanamicina el agente de selección bacteriano para ambos grupos de colonias). Luego de 48 h. de incubación a 28°C, las colonias *promVviZFP13::GUS* y *promVviZFP68::GUS* transformadas positivamente fueron chequeadas por PCR. Las bacterias recombinantes fueron utilizadas para transformar células de *N. benthamiana* por medio de la infección de discos de hoja, siguiendo el protocolo descrito por Clemente [259]. Discos de hojas de tabaco fueron infectadas con la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 conteniendo la construcción *promVviZFP13::GUS* o *promVviZFP68::GUS* y crecidas en modo césped sobre medio YEB sólido. Luego de la infección, los discos fueron incubados en medio M3 (4,4 g/L MS, 0,2 g/L MES, 3% p/v de sacarosa, 2 mg/L BAP, 0,075 mg/L AIA y 0,5 % p/v de agar planta) durante 48 hrs en oscuridad a 22-23 °C. Transcurrido este período, los discos se lavaron con una solución de MS con antibiótico (500 mg/L de Cefotaxima) para eliminar el *Agrobacterium*. Finalmente, los discos fueron transferidos al medio inductor de brotes 3KC (4,4 g/L MS, 0,2 g/L MES, 2% p/v de sacarosa, 2 mg/L BAP, 0,075 mg/L AIA, 250 mg/L cefotaxima, 100 mg/L kanamicina y 0,5 % p/v de agar planta). Los brotes transgénicos fueron enraizados en medio MS con los respectivos antibióticos de selección y finalmente establecidos *ex vitro* para generar plantas T0 adultas. Las líneas transgénicas generadas fueron analizadas por PCR para detectar la inserción del transgen. Luego de enraizadas, las plántulas fueron pasadas a un medio inerte de Turba/vermiculita/fibra de coco (2:1:1) en condiciones de invernadero para aclimatación *ex vitro*. Las plantas T0 fueron crecidas hasta la obtención de semillas las que fueron seleccionadas en medio MS con los antibióticos respectivos, para así generar las líneas T1 que fueron analizadas en este trabajo de tesis. Cada planta fue validada por PCR, buscando amplificar un fragmento del transgén.

3.2.3 Búsqueda de elementos en *cis* en regiones promotoras de genes *VviZFP* candidatos.

Desde la base de datos del cultivar 'Carmenere' [260] se extrajeron 2000 pb río arriba del codón de inicio de la transcripción de los *VviZFP* seleccionados. La predicción de elementos en *cis* en las regiones promotoras se realizó con las herramientas web PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) [261] y PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Se seleccionaron elementos en *cis* asociados a respuestas hormonales, expresión específica de polen y otros como elementos como sitios CArG-box, elementos de respuesta a luz y elementos de respuesta FTs.

3.2.4 Ensayos de tinción histoquímica de β -glucuronidasa (GUS)

Los tejidos fueron colectados desde las plantas *promVviZFP13::GUS* y *promVviZFP68::GUS* con la ayuda de un bisturí estéril en tubos de 15 ml. Las tinciones histoquímicas para GUS se llevaron a cabo mediante la incubación de los diferentes tejidos u órganos en agitación suave durante tres horas a 37°C en una solución reveladora (100 mM NaPO₄ buffer pH 7.0, conteniendo 0.5 mM ferricianida de potasio, K₃Fe(CN)₆, 0.1% Triton X-100, 10 mM EDTA, 0.5 mM β -Mercaptoetanol, 1mg/ml X-Gluc (PhytoTechnology Laboratories, KS, USA)). Transcurrido el tiempo, se eliminó la solución reveladora y se fijaron las muestras durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente con una solución de fijación (42,5% v/v agua estéril, 42,5% v/v etanol absoluto, 5% v/v ácido acético glacial y 10% v/v formalina). Posteriormente, se elimina la solución de fijación, reemplazándola por una solución de decoloración de metanol/acetona (3:1) para remover clorofila y otros pigmentos. Las muestras se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente durante ciclos de 30 minutos, para luego reemplazar la solución de decoloración hasta que no se vea clorofila en la solución y el tejido esté notoriamente decolorado. Finalmente, las muestras fueron conservadas en etanol 70%, visualizadas en un microscopio estereoscópico o microscopio óptico y fotografiadas.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Todos los genes *VviZFP* seleccionados presentan una dinámica de expresión durante el desarrollo floral en la vid

La información generada en los capítulos anteriores de este trabajo de tesis ha permitido (1) identificar un grupo reducido de genes *VviZFP* cuya participación en el desarrollo del polen es más probable, y (2) determinar el momento del desarrollo floral en que están ocurriendo los eventos del desarrollo reproductivo masculino (particularmente el desarrollo del polen). Esta información permite interpretar de mejor manera los análisis de caracterización de los genes candidatos propuestos. En base a esto, se evaluó la expresión génica de 7 genes *VviZFP* durante el desarrollo floral en la vid cultivar 'Carmenere' (Figura 24), ya que este parece ser un modelo interesante para comprender el desarrollo del polen debido a la alta tendencia que presenta al DFP [6]. Los análisis de qRT-PCR revelaron que los genes *VviZFP* seleccionados se expresan en flores con diferentes especificidades en términos de etapa de desarrollo (basándose en la escal E-L). De manera general, todos los genes *VviZFP* evaluados mostraron una dinámica de expresión a lo largo del desarrollo de la flor (Figura 16). Efectivamente, los genes seleccionados del clúster de expresión ascendente, *VviZFP13*, *VviZFP30*, *VviZFP68* y *VviZFP81* presentaron un aumento progresivo de la expresión durante las etapas evaluadas y podrían representar buenos candidatos para dilucidar la regulación de este proceso en la vid.

VviZFP13, el putativo ortólogo de los genes *DAZ1/DAZ2* de arábidoopsis [77], no reportó niveles de acumulación de transcritos en las primeras etapas evaluadas (Figura 24. D). Desde E-L14, la expresión de *VviZFP13* presenta una dinámica creciente, con los mayores niveles en las últimas etapas evaluadas (E-L18 y E-L19). En estas etapas, el desarrollo del polen ya se ha llevado a cabo mayoritariamente, lo que sugiere que estos genes en la vid podrían estar participando en procesos posteriores al desarrollo del polen (como en la elongación del tubo polínico o eventos de fecundación). El contraste de la expresión de *VviZFP13* con la de los genes homeótico evaluados (Figura 21), podría sugerir que este gen no es directamente regulado por la acción de factores homeóticos, ya que desde E-L16 la mayoría de estos genes presentan una reducción importante del nivel de expresión.

Los genes *VviZFP30* y *VviZFP68* presentan un porcentaje de identidad sobre el 50% con el *C2H2-ZFP* de petunia *MEZ1* [114], lo que sugiere una posible conservación de función entre estos genes. Ambos presentan un perfil de expresión similar en las etapas evaluadas. En general, su expresión es baja en las primeras dos etapas, para luego aumentar gradualmente desde E-L14 hasta alcanzar el peak en E-L16 para el caso de *VviZFP30* y E-L17 para *VviZFP68* (Figura 24). Contrastando con las observaciones por microscopía, la expresión de estos genes parece ocurrir mayoritariamente luego de la meiosis del polen, ya que desde E-L16 es posible observar tétradas de microsporas. Los perfiles de expresión de ambos *VviZFP* parecen

desfasados al contrastarlos con la expresión de genes homeóticos, esto sugiere que la regulación de la expresión de ambos genes candidatos no es llevada a cabo (al menos directamente) por factores homeóticos.

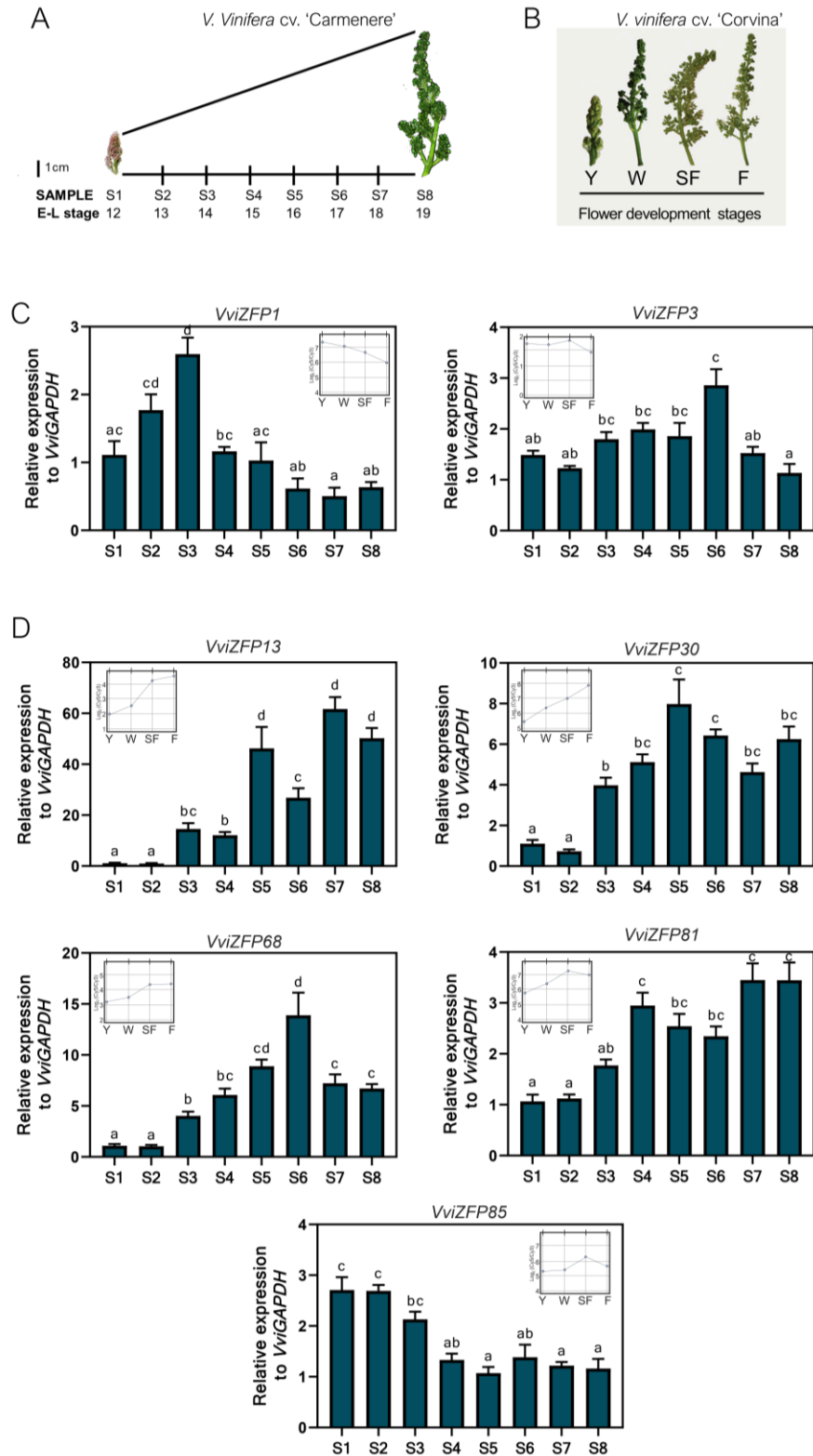


Figura 24 (Página anterior). Expresión de genes *VviZFP* candidatos durante el desarrollo floral en la vid. Detalles de las muestras usadas en (A) los análisis de qRT-PCR y su correspondiente etapa en el sistema E-L y (B) las muestras analizadas desde el atlas de expresión de la vid [101]. Expresión relativa de genes candidatos seleccionados de los patrones de expresión decreciente (C) y ascendente (D) a lo largo del desarrollo floral. Los niveles de transcritos fueron normalizados a la expresión de *VviGAPDH*. Los bigotes representan el SEM de cuatro replicas biológicas y tres técnicas. El eje X representa etapas del desarrollo de inflorescencias completas. Las diferencias significativas (valor p, 0.05) en la expresión entre muestras es indicada con letras diferentes (Prueba de Tukey).

Del grupo con un patrón de expresión descendiente, se evaluó la expresión de *VviZFP1* y *VviZFP3* (Figura 24. C). La comparación de secuencias aminoacídicas indicó que *VviZFP1* presenta un porcentaje de identidad importante con los factores de transcripción de petunia PhZPT4-2 y PhZPT4-3, así como con BcMF20 de *B. campestris*. En el cultivar 'Carmenere', el gen *VviZFP1* presentó los niveles más altos de expresión durante las primeras etapas del desarrollo floral (muestras S1 a S3, equivalente a E-L12 a E-L14), disminuyendo su expresión paulatinamente conforme la flor se desarrolla. En el análisis *in silico* (Figura 16A), *VviZFP3* presenta un bajo nivel de expresión durante el desarrollo floral y ninguna expresión en el polen. De manera similar, *VviZFP3* presenta un bajo nivel de acumulación de transcritos durante el desarrollo floral en el cultivar 'Carmenere', siendo E-L17 la etapa con mayor expresión.

3.3.2 Identificación de elementos en *cis* en la región promotora de *VviZFPs* candidatos

Para tratar de entender las bases moleculares que expliquen el perfil transcripcional de los genes *VviZFP* seleccionados, se realizó un análisis *in silico* de las regiones promotoras de 7 genes *VviZFP* específicas del genoma del cultivar 'Carmenere'. utilizando las bases de datos PLACE [261] y PlantCARE [262]. Se identificaron sitios o elementos de respuesta a giberelinas en todas las secuencias analizadas con diferentes niveles de enriquecimiento (Figura 25). Además, salvo por el promotor de *VviZFP85*, se identificó que las demás secuencias presentan elementos de respuesta a las rutas de señalización del ácido absísico y auxinas. Distintos niveles de enriquecimiento con elementos de respuesta a etileno, citoquinina y metil-jasmonato fueron identificados en los promotores evaluados. Solo *VviZFP13* presenta un elemento de respuesta al ácido salicílico dentro de los 2000 pb de promotor evaluado. Estos resultados en su conjunto sugieren que los *VviZFPs* candidatos podrían estar integrando diferentes rutas de señalización mediadas por fitohormonas y su relación deberá ser confirmada de manera experimental. Por otra parte, el análisis permitió identificar elementos de unión para FTs, presentes de manera diferencial en los promotores evaluados. El promotor de *VviZFP30* posee un elemento del tipo

CARGATCONSENSUS y un elemento del tipo CARGCW8GAT, ambos clasificados como sitios CARG-box. Además, esta secuencia presenta un sitio de unión para AGAMOUS (WUSATAg).

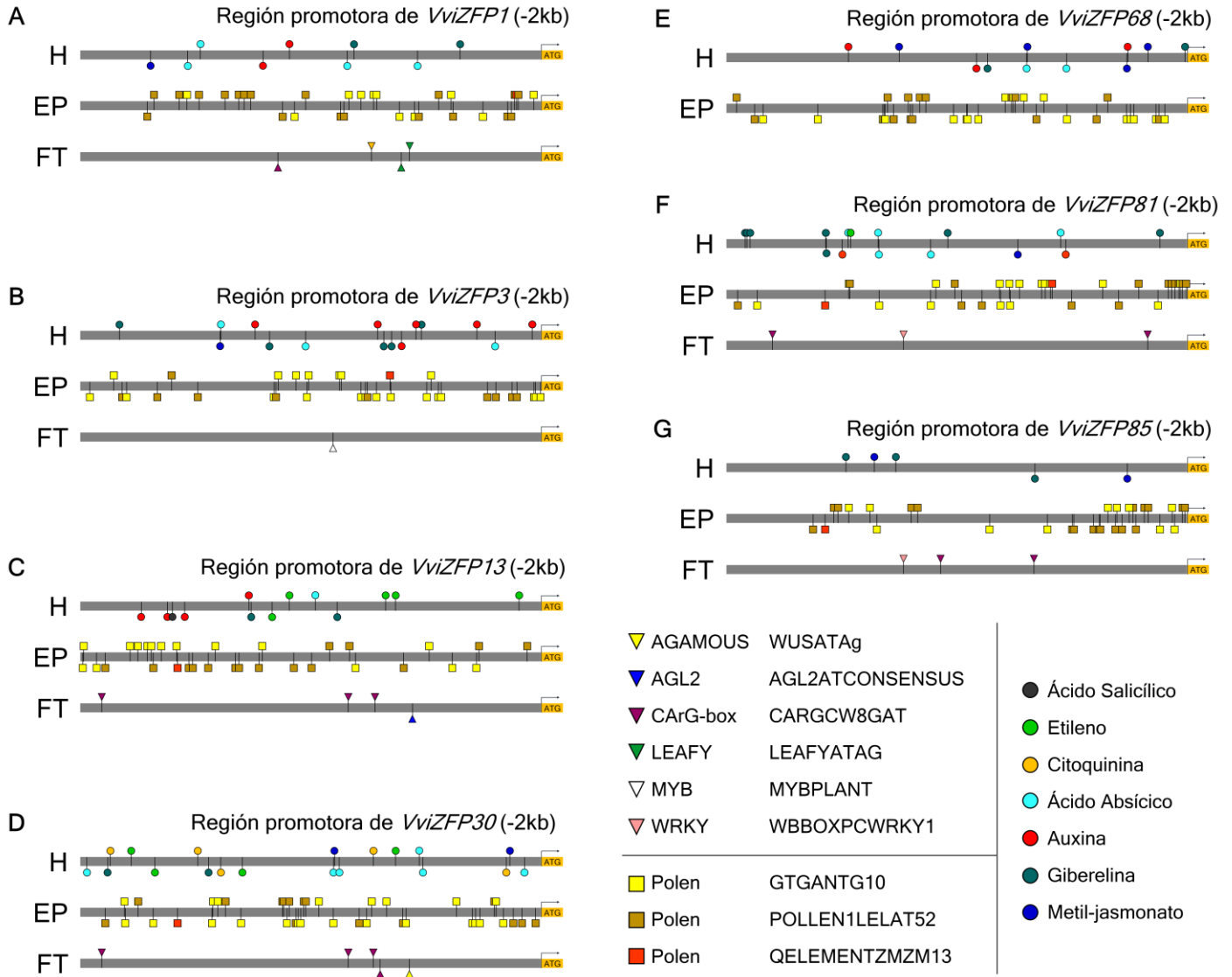


Figura 25. Vista esquemática del enriquecimiento con elementos *in cis* de secuencias promotoras (2000pb) en genes *VviZFP* candidatos. Se separaron los elementos identificados en elementos de respuesta a hormonas (H), de expresión específica en polen (EP) y de unión para Factores de Transcripción (FT).

De igual manera, la presencia del elemento CARGCW8GAT fue identificado en las regiones promotoras de *VviZFP1* (1 elemento), *VviZFP13* (3 elementos), *VviZFP81* (2 elementos) y *VviZFP85* (2 elementos). De manera interesante, se detectó un elemento AGL2ATCONSENSUS en el promotor de *VviZFP13*. AGL2ATCONSENSUS corresponde a un elemento de unión para el factor de transcripción AGAMOUS-LIKE2 (AGL2), (renombrado posteriormente como SEP1), una proteína involucrada en el

desarrollo todos los verticilos florales. La presencia de estos elementos de manera diferencial en la región promotora de los *VviZFPs* candidatos indican que su expresión génica podría estar siendo regulada, en parte, por factores homeóticos que regulan el desarrollo floral descritos anteriormente. Otros elementos de interés que fue posible identificar con el análisis corresponden a: Elemento LEAFYATAG (2 sitios), para unión de LEAFY, en el promotor de *VviZFP1*; Elemento MYBPLANT (1 sitio), para unión de factores MYB, en el promotor de *VviZFP3*; Elemento WBOXPCWRKY1 (1 sitio), para unión de factores de transcripción WRKY, en el promotor de *VviZFP81*. No se encontró elementos para unión de factores de transcripción en el promotor de *VviZFP68*.

Otro punto interesante es el nivel de enriquecimiento con elementos de expresión en polen de los promotores evaluados. En todas las secuencias se identificaron los elementos GTGANTG10 y POLLEN1LELAT52, mientras que en cuatro de ellos se detectó el elemento QELEMENTZM13. El elemento GTGANTG10 posee la secuencia patrón GTGA y fue identificado en la región promotora del gen de tabaco *G10*, homólogo al gen *LAT56* de tomate. La expresión relacionada al elemento GTGANTG10 ha sido posicionada en polen tardío [263]. El otro elemento encontrado, POLLEN1LELAT52, es uno de los dos elementos responsables de la activación polen-específica de la expresión del gen *LAT52* de tomate [264]. Este elemento ha sido identificado también en el promotor del gen *LeMAN5* de tomate, dirigiendo su expresión polen específica [265]. Finalmente, el tercer elemento identificado en las regiones promotoras de *VviZFP1*, *VviZFP3*, *VviZFP13* y *VviZFP81* es QELEMENTZM13. Este elemento fue identificado en el gen de expresión polen-específica *ZM13* de maíz, un homólogo de *LAT52* de tomate [266]. Por lo tanto, los elementos GTGANTG10, POLLEN1LELAT52 y QELEMENTZM13 han sido vinculados a expresión polen-específica en tabaco, tomate y maíz [263,264,266] y su identificación en los promotores de *VviZFPs* analizados da cuenta de la posible participación de estos genes en el desarrollo del polen. Sin embargo, para tener un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares detrás de dicha regulación se requieren nuevas investigaciones.

3.3.3 Estudio de la expresión tejido específico de genes *VviZFP13* y *VviZFP68* en plantas transgénicas de *N. benthamiana*

Para definir los patrones de expresión espacio temporal de los genes candidatos es necesario conocer cuándo y dónde, en el contexto del desarrollo floral, están expresándose estos genes. Mediante los análisis de expresión relativa por qRT-PCR fue posible determinar la dinámica de estos genes durante el desarrollo floral en la vid. Para responder respecto al “donde” está ocurriendo la expresión génica de los *VviZFPs* candidatos, se determinó la actividad del promotor de dos genes candidatos (*VviZFP13* y *VviZFP68*) mediante el sistema reportero GUS [267] en órganos florales de plantas de *N. benthamiana* transgénicas que portan la construcción *promVviZFP::GUS*. La selección de estos dos genes se debe a que, para ambos casos, el putativo ortólogo ya ha sido caracterizado en otras especies modelo. Esto facilita la interpretación y comparación de los resultados obtenidos. Luego de la generación y validación de líneas transgénicas, se procedió al ensayo de tinción histoquímica GUS, en flores con distintos estados del desarrollo. En individuos T1 de plantas transgénicas que portan la

construcción *promVviZFP13::GUS*, no fue posible detectar la actividad del promotor hasta que las flores estuvieron totalmente desarrolladas. En este estado, la tinción histoquímica se observó específicamente en anteras, granos de polen y estigma (Figura 26. A-C), no siendo detectada en sépalos ni pétalos.

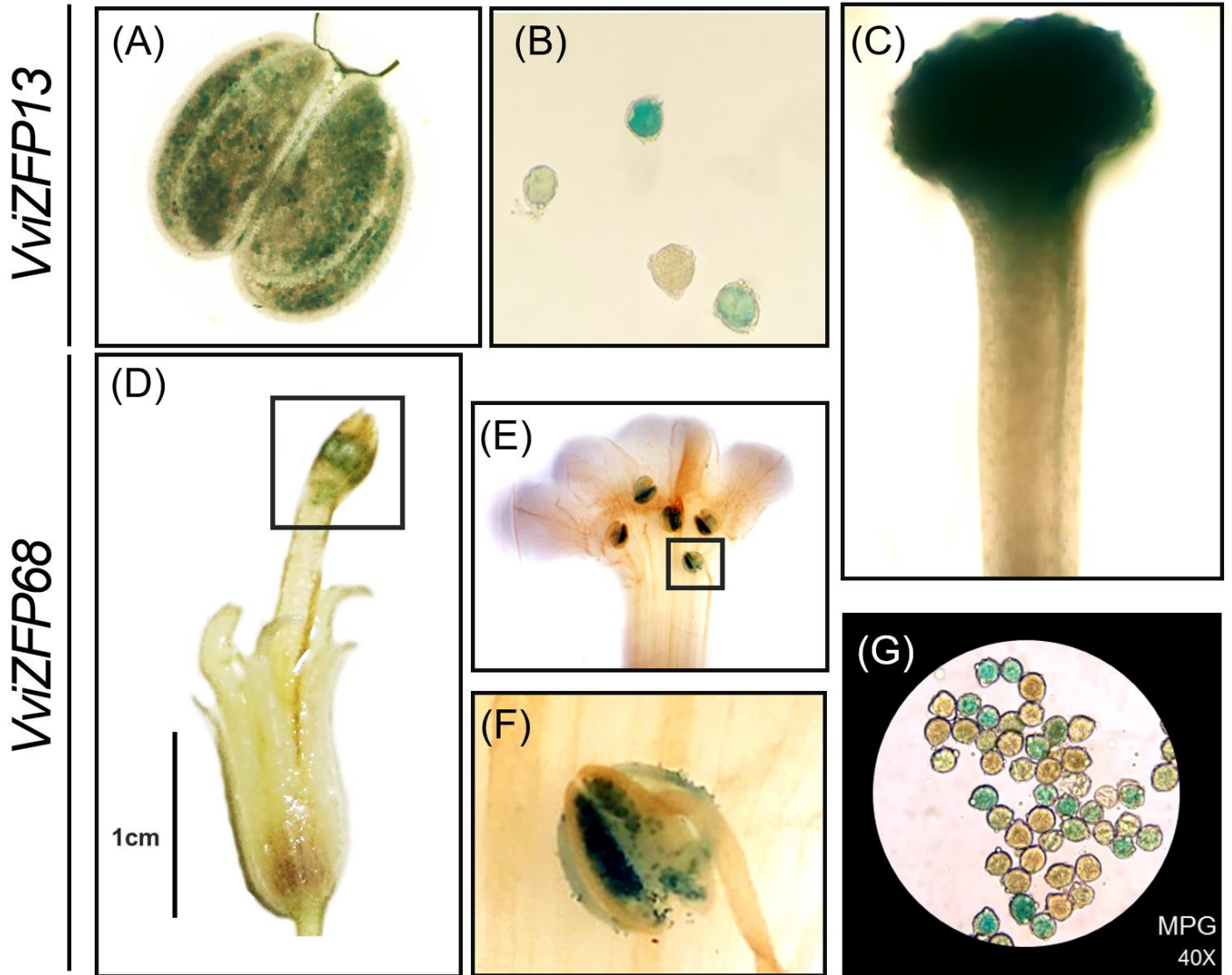


Figura 26. Patrones de expresión génica de *VviZFP13* y *VviZFP68* en tejidos florales. Análisis de tinción histoquímica GUS en flores maduras de *N. benthamiana* transgénicas que portan las construcciones *promVviZFP13::GUS* (A-C) y *promVviZFP68::GUS* (D-G). (A) antera madura; (B) grano de polen maduro; (C) Estigma y estilo; (D) flor entera; (E) flor abierta manualmente y (F) primer plano de anteras; (G) Granos de polen maduros. MPG: grano de polen maduro (*mature pollen grain*)

La expresión de *VviZFP13* en las anteras (entendida por la actividad del promotor en sistema heterólogo) se limitó a las células gametofitas masculinas (Figura 26.A), lo que se confirmó al observar la tinción específicamente en granos de polen

maduros desde el vaciado de anteras (Figura 26. B). Debido a la segregación del transgén, la señal GUS fue detectada en algunos granos de polen (los que hipotéticamente portan la construcción *promVviZFP13::GUS*). Interesantemente, la señal GUS fue también detectada de manera intensa en tejido estigmático (Figura 26. C), no así en estilo ni ovarios. Estos resultados en su conjunto sugieren que *VviZFP13* cumpliría su función en el desarrollo del gametofito masculino (en concordancia con los putativos ortólogos *AtDAZ1* y *AtDAZ2*), pero que también podría estar participando en eventos propios del gametofito femenino o en la comunicación polen-estigma.

De manera similar, en las líneas transgénicas que portaban la construcción *promVviZFP68::GUS* (Figura 26. D-G) fue posible detectar actividad GUS solo en flores totalmente desarrolladas (Figura 26. D). No se observó tinción durante el desarrollo floral temprano ni en estados intermedios para esta línea. En flores desarrolladas, la actividad del promotor de *VviZFP68* fue detectada exclusivamente en anteras (Figura 26. E, F), no presentándose tinción en sépalos, pétalos, ni carpelos. A su vez, la actividad GUS en anteras se limita al gametofito masculino (granos de polen), estando ausente en tejido esporofítico (capas celulares de la antera) (Figura 26. F, G).

Los patrones de expresión tejido específico de los genes *VviZFP13* y *VviZFP68*, que se infieren desde los ensayos de tinción histoquímica GUS, sugieren que ambos genes podrían cumplir una función en el desarrollo de granos de polen y son candidatos interesantes para caracterizar profundamente en ensayos posteriores. Además, la expresión de *VviZFP13* en tejido estigmático podría ser indicativo de putativas funciones para este gen, nuevas con respecto a lo publicado.

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 Regulación transcripcional de C2H2-ZFP en el desarrollo de órganos florales

En petunia, se profundizó en la comprensión de un subgrupo de C2H2-ZFP, aquellos que contenían la secuencia específica de plantas QALGGH en sus dominios ZF fueron renombrados como familia EPF. De esta familia, siete miembros se expresan predominantemente y cinco de ellos específicamente en anteras, sugiriendo una posible participación de estos FTs en el desarrollo de anteras y polen. Los análisis detallados de sus patrones de expresión revelaron que este grupo de genes se expresa dentro de la antera, predominantemente en el polen, de manera secuencial desde la etapa de meiosis hasta la dehiscencia (Figura 23) [67-69]. Este patrón de expresión secuencial se asemeja a la cascada reguladora de factores de transcripción que controlan la embriogénesis de *Drosophila* [268,269]. En un huevo de *Drosophila* fertilizado, los FTs codificados por los ARNm (de origen materno) forman gradientes a lo largo del eje anteroposterior o dorsoventral. Este gradiente desencadena la aparición de cascadas reguladoras que integran varias clases de factores de transcripción, procediendo de una manera dependiente de la posición de acuerdo con los gradientes iniciales de los ARNm maternos [269]. Una serie de eventos del desarrollo, incluida la segmentación del embrión, la especificación e identidad de los segmentos, siguen a la regulación secuencial (regulación positiva y negativa de la expresión) de los FTs descendentes por parte de los ascendentes en la ruta. De manera análoga, el desarrollo de anteras y polen a partir de células indiferenciadas de primordios de estambre también podría estar regulado por una cascada reguladora que involucra varios factores de transcripción. Y las proteínas EPF muy bien podrían formar la columna vertebral de la red regulatoria involucrada en el desarrollo de este órgano masculino. Sin embargo, esta hipótesis se basa únicamente en los patrones de expresión y debe examinarse mediante métodos bioquímicos y genéticos inversos [67-69].

Utilizando toda la información generada para indagar sobre la posible función de los genes ZFP en la vid, se analizaron los patrones de expresión espacio-temporal durante el desarrollo floral de 7 genes VviZFP candidatos (Figura 24). Al contrastar los perfiles de expresión de los genes VviZFPs candidatos con la información sobre ZFPs relacionados al desarrollo del polen en plantas modelo, se observan tanto similitudes como diferencias interesantes. En petunia, los genes *PETHy;ZPT4-2* y *ZPT4-3*, presentan una dinámica de expresión tejido y temporal similares, en las últimas etapas del desarrollo de anteras [68]. En el genoma de la vid, se identificó solo un solo gen (*VviZFP1*) como el homólogo putativo de estos dos genes de petunia. Los análisis filogenéticos refuerzan la relación entre *VviZFP1*, *ZPT4-2* y *ZPT4-3* ya que se agrupan juntos en un clado (Clado I) (Figura 27). De manera interesante, el FT de *Brassica campestris* ssp. *chinensis* específico de polen BcMF20 se agrupó junto a *VviZFP1*, *ZPT4-2* y *ZPT4-3* en el árbol filogenético. En el contexto del desarrollo floral de la vid, *VviZFP1* se expresa durante las primeras etapas de desarrollo evaluadas (desde E-L13 a E-L15), disminuyendo su expresión paulatinamente conforme la flor se desarrolla. Este patrón de expresión es consistente con el momento en que ocurre la microesporogénesis del polen (Tabla 5), lo que sumado al enriquecimiento de la región promotora de *VviZFP1* con

elementos de expresión específica en polen, sugieren a este gen como un candidato interesante para estudios posteriores. Otro antecedente interesante es que la *VviZFP* de mayor identidad de secuencia con *MAZ1* (AT5G15480.1) de *Arabidopsis* [256] es *VviZFP1*. Sin embargo *VviZFP1* codifica para una proteína con 4 dominios C2H2-ZF mientras que *MAZ1* para una proteína con 2 dominios C2H2-ZF, compartiendo un 27,7% de identidad de secuencia. En el mismo análisis, se observa que *VviZFP1* (con 4 dominios ZF) está filogenéticamente relacionado en un clado con *VviZFP81* y *VviZFP85* (ambos con 3 dominios ZF), a pesar de la diferencia en el número dominios ZF. *VviZFP81* se ha postulado como putativo ortólogo de *PhZPT3-3* y su expresión ha sido detectada en polen y semilla en la vid en otros trabajos (datos no mostrados, publicados en tesis doctoral de Puentes AC). El gen *PhZPT3-3* ha sido caracterizado de manera similar por Kubo y colaboradores [112] durante el desarrollo floral de petunia usando el sistema reportero GUS. En este modelo, se detectó la actividad GUS, comandada por el promotor de *PhZPT3-3*, en tejido femenino (estilo y estigma). Es interesante la actividad GUS de *PhZPT3-3* detectada en estigma, similar a lo observado para *VviZFP13* (Figura 26. C), debido a la importancia que tiene este órgano durante los eventos de polinización. *VviZFP85* por su parte, presenta una mayor identidad con el gen *SHOOT GRAVITROPISM5/ARABIDOPSIS THALIANA INDETERMINATE(ID)-DOMAIN 15 (SGR5/IDD15)*, que codifica para un factor de transcripción que junto con *AtIDD14* y *AtIDD16*, regula la biosíntesis y transporte de auxinas. Estas proteínas participan en la morfogénesis de órganos aéreos y en la respuesta gravitropica, estando entonces involucradas en eventos tempranos del gravitropismo de brotes y en la percepción de la gravedad [115]. Junto a *VviZFP85* y *AtSGR5/IDD15* se agrupó el factor de transcripción *TAZ1*. *TAZ1* cumple una función esencial en el desarrollo del tapetum, durante la fase post-meiosis, en petunia [255]. En plantas transgénicas con el gen *TAZ1* silenciado (mediante cosupresión), se observó una degradación prematura del tapetum antes de su proliferación celular, afectando negativamente la maduración de microsporas. Sin embargo, en el genoma de la vid no se encontró un *VviZFP* que, en base a la identidad de secuencias, pueda ser propuesto como putativo ortólogo de *TAZ1*. El alineamiento entre la secuencia aminoacídica de *VviZFP85* y *PhTAZ1* indica un 20.96% de identidad entre ambas, reafirmando la hipótesis de que no existen ortólogos de *TAZ1* en el genoma de la vid.

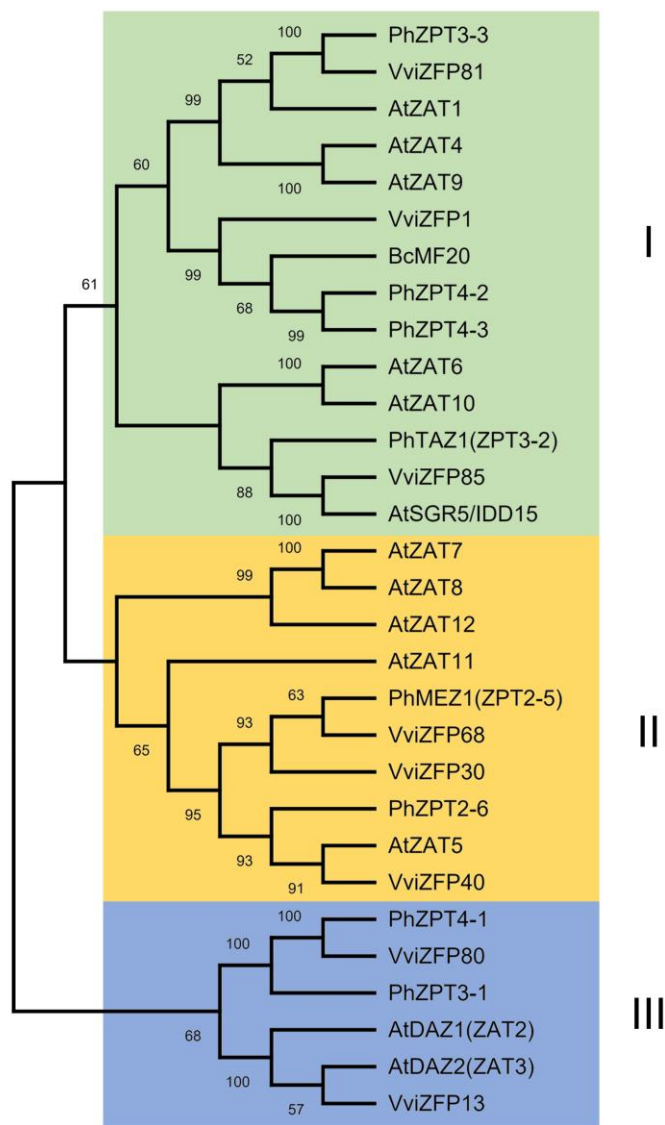


Figura 27. Relaciones filogenéticas entre VviZFP candidatos y C2H2-ZFP de otras especies de interés. Árbol filogenético sin raíz construido por el método NJ utilizando alineamientos de secuencias de aminoácidos de longitud completa. No se muestran los valores de *bootstrap* inferiores a 50.

Por otro lado, el clado II integra a los candidatos VviZFP68 y VviZFP30, ambos putativos ortólogos de PhMEZ1 siendo VviZFP68 el más relacionado filogenéticamente de los dos (Figura 27). En petunia, la expresión de *PhMEZ1* se detecta mayoritariamente en anteras desde CMP y disminuye precipitadamente en un momento coincidente con el inicio de la degeneración del tapetum [114]. Sin embargo, la expresión de los genes *VviZFP68* y *VviZFP30* en 'Carmenere' se detectó de

manera continua y creciente durante el desarrollo floral, alcanzando los mayores niveles en E-L16 y E-L17 (para *VviZFP30* y *VviZFP68* respectivamente). Al observar las regiones promotoras de estos genes se puede indicar que están altamente enriquecidas con elementos de expresión específica en polen y con elementos que integran las rutas de señalización hormonales. Los promotores de *VviZFP30* y *VviZFP68* comparten elementos de respuesta a ABA, GA y MeJA, mientras que en el promotor de *VviZFP30* se identificaron elementos de respuesta a ET y CK y en el promotor de *VviZFP68* se identificaron elementos de respuesta a AUX (Figura 25). Esta información permite sugerir de estos genes que pudiesen cumplir su función integrando las rutas de señalización comandada por fitohormonas. La presencia de estos elementos fue también identificada en la región promotora de *PhMEZ1*, la que se encuentra enriquecida con elementos de expresión en polen y de respuesta a hormonas, así como de respuesta a FTs del tipo homeóticos (Figura 28). El promotor de *VviZFP68* carece de sitios CArG-box que respondan a factores homeóticos, a diferencia de los que se encuentran en *VviZFP30* y *PhMEZ1*, lo que puede indicar que este gen no está regulado directamente por genes homeóticos en la vid. Sin embargo, la actividad específica en granos de polen maduros que presenta el promotor de *VviZFP68* (Figura 26) podría indicar que este gen participa en el desarrollo del gametofito masculino, posiblemente integrando la red reguladora dirigida por genes homeóticos, sin ser un blanco directo de estos factores.

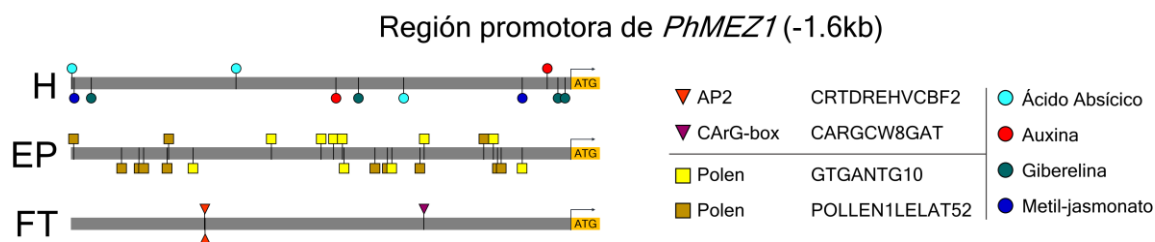


Figura 28. Vista esquemática del enriquecimiento con elementos *in cis* de secuencias promotoras (1600pb) en *PhMEZ1*. Se separaron los elementos identificados en elementos de respuesta a hormonas (H), de expresión específica en polen (EP) y de unión para Factores de Transcripción (FT).

El clado III del árbol filogenético está representado por los factores de transcripción DAZ de arábidopsis (*DAZ1* y *DAZ2*) agrupados junto a *VviZFP13*. Los genes *DAZ1* y *DAZ2*, de función redundante, son regulados por el factor de transcripción de la familia MYB DUO POLLEN1 (DU01) en el gametofito de arábidopsis [270]. La expresión de *DAZ1* y *DAZ2* es detectada en células germinales luego de la división de microsporas e incrementa durante el desarrollo, persistiendo en granos de polen maduros [77]. Ambos genes son necesarios para la acumulación de ciclinas mitóticas en la línea germinal masculina, induciendo la mitosis en estas células. Además, promueven la expresión de genes involucrados en la diferenciación celular,

por lo que su función es clave para lograr una fertilización exitosa [77]. En plantas mutantes *duo1*, las células germinales no logran entrar en mitosis. Sin embargo, el fenotipo puede ser recuperado expresando los genes *DAZ* (comandado por el promotor de *DUO1*) en estas plantas. En concomitancia, las células germinales de plantas mutantes *daz1-2* no logran entrar en división mitótica ni pueden ser rescatadas por la expresión normal de *DUO1* [77]. La regulación transcripcional de *DUO1* también parece conservada en arroz [271] y se ha sugerido, basado en el estudio comparado en musgos, que la aparición de *DUO1* fue un evento definitorio en la evolución de la diferenciación de la línea germinal y los variados modos de reproducción sexual presentes en el linaje de las plantas terrestres [272]. Algunos estudios de transcriptomas sugieren que el patrón de expresión polen-específico no es solo específico de las Brassicaceae (familia de *Arabidopsis*). En la fresa (*Fragaria vesca* L.), el gen *DUO1* presenta una expresión específica de anteras (etapas tardías) y el nivel de expresión fue mayor en muestras de polen aislado [273]. En el atlas de expresión de la vid publicado por [101] se observa que la expresión de *VviDUO1* (VIT_215s0021g02040.1) es específica de polen, sin embargo, no existen reportes que caractericen *VviDUO1* en esta especie.

En la vid, se identificó a *VviZFP13* como único ortólogo de los genes *DAZ1* y *DAZ2*. *VviZFP13* parece estar más relacionado filogenéticamente con *DAZ1*, tal como se observa en el árbol (Figura 27). La expresión de *VviZFP13* en el cultivar 'Carmenere' está ausente en las primeras etapas, comenzando desde E-L14 y aumentando gradualmente desde E-L16 hasta E-L19. Contrastando con las observaciones de microscopía, la expresión de *VviZFP13* se detecta durante todo el desarrollo del polen, incluyendo el momento de microesporogénesis, con un *peak* en etapas tardías de maduración del polen y dehiscencia de anteras (Figura 24 y Tabla 5). La región reguladora de *VviZFP13* está altamente enriquecida con elementos de expresión específica en polen y elementos de respuesta a fitohormonas (Figura 25, C), además de elementos *CArG*-box y *AGAMOUS*-like, lo que sugiere que la regulación de este gen podría ser en parte por factores homeóticos. Sumado a esto, la región promotora de *VviZFP13* de 'Carmenere' presentó actividad en anteras, específicamente en los granos de polen maduros (Figura 26. A-B), de manera similar a la expresión reportada para los genes *DAZ*. Además, se observó que *VviZFP13* se expresa fuertemente en el estigma, lo que sugiere que este gen podría estar relacionado con otras funciones en el desarrollo de la flor del cultivar 'Carmenere'. Estos antecedentes nos permiten sugerir al gen *VviZFP13* como putativo ortólogo de los genes *Arabidopsis* *DAZ1/DAZ2* y como un candidato interesante para ser validado funcionalmente en trabajos futuros.

No se evaluó la expresión relativa de *VviZFP80* en el cultivar 'Carmenere', como putativo ortólogo de *PhZPT4-1*, basándose en el análisis filogenético (Figura 27). La expresión de este gen en petunia, es detectada en anteras durante las etapas tardías y finales del desarrollo de anteras [68]. Basándose en el análisis de expresión *in silico*, se puede indicar que la expresión de *VviZFP80* es mayoritariamente en etapas tardías del desarrollo floral, desde el inicio de la floración (Figura 16. A). Además, se observa una alta expresión en muestras de polen y estambres. Esto sugiere a *VviZFP80* como un gen candidato interesante para caracterizar en estudios futuros [274].

Varias herramientas celulares y genéticas, incluido el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, por su sigla en inglés)/ Proteína asociada a CRISPR9 (CAS9) (sistema CRISPR/Cas9), han sido estandarizadas para algunos cultivos frutales perennes como la vid [275]. Desde 2016, los sitios que son apropiados para la edición del genoma de la vid basada en CRISPR/Cas9, están disponibles a través de una base de datos de acceso público [276]. Hasta la fecha, hay un número creciente de informes sobre el uso de CRISPR/Cas9 para la edición del genoma en vid [277–283], reafirmando que estas herramientas podrían ser utilizadas para la caracterización funcional de los genes *VviZFP* en el contexto del desarrollo reproductivo como un poderoso enfoque de genética inversa. La expresión global de la familia *VviZFP* en varios tejidos y etapas de desarrollo (Figura 15) sugiere que estos genes están ampliamente relacionados con la regulación de varios procesos. En plantas, se ha reportado una gran cantidad de C2H2 ZFP que participan en la respuesta transcripcional frente a estrés ambiental y/o que integran las respuestas hormonales, pero debido al enfoque de este trabajo no se han analizado. Como ejemplo, *VviZFP3* se identifica en un análisis Blast como el ortólogo putativo de *DEFECTIVELY ORGANIZED TRIBUTARIES5 (DOT5)* de *Arabidopsis* [284]. Las plántulas con mutaciones en *DOT5* presentan un defecto en el patrón de venación en sus hojas y cotiledones. *VviZFP3* y *AtDOT5* comparten un 68,7% de identidad de secuencia con una alta conservación de los dominios ZF, lo que sugiere posibles funciones de un *VviZFP* aún no caracterizado en la vid.

4. DISCUSION GENERAL

Luego de la inducción de la floración, la periferia del SAM sufre una transformación hacia un MF. A su vez, los MFs generan cuatro verticilos de desarrollo distintos que constituirán, luego de un regulado proceso, los órganos florales discretos. La identidad de cada órgano floral está determinada por la acción coordinada de genes homeóticos florales específicos; sintetizado en la actualidad en el modelo (A)B(C) [18] (Figura 29). Sin embargo, este modelo todavía es insuficiente para comprender la formación y variedad en la morfología de órganos florales. Más aún, la investigación reciente ha identificado que algunos FTs posicionados aguas arriba o aguas abajo de los factores homeóticos florales cumplen una función redundante y participan de manera similar en el desarrollo de los órganos florales [51]. Entre las familias de proteínas vinculadas a este proceso destacan las C2H2-ZFP, cuyos mecanismos de regulación están cruzados por interacciones complejas entre FTs, modificación epigenética, proliferación celular y regulación hormonal. El análisis de la expresión génica, el estudio de líneas transgénicas y la secuenciación masiva de genomas y transcriptomas han colaborado en dilucidar el papel de las C2H2-ZFP en el desarrollo floral en especies modelo, pero su estudio en la vid no se ha realizado hasta antes de este trabajo de tesis.

La familia *VviZFP* se compone por 98 genes distribuidos ampliamente en los 19 cromosomas del genoma de la vid. Estos genes codifican para proteínas con un número y ubicación variable de dominios ZF, lo que sirve para su clasificación. El análisis de Ontología Génica indicó que los *VviZFP* cumplen su función biológica mayoritariamente en procesos del desarrollo y crecimiento mediante la regulación de la expresión de otros genes (característica común de los FT). Desde la identificación masiva y caracterización, se puso especial atención a un grupo de *VviZFPs* candidatos cuya dinámica de expresión tejido específica y similitud de secuencias con otros ZFP previamente descritos sugieren una participación en los eventos del desarrollo floral (genes *VviZDP*) (Figura 29).

Ya que lo siguiente era evaluar la dinámica de expresión de los genes *VviZDP* candidatos durante el desarrollo del polen en el cultivar 'Carmenere', se hizo necesario posicionar este proceso dentro de la escala del desarrollo E-L., considerando que el momento en que ocurren los eventos del desarrollo del polen varía entre cultivares de la misma especie [215,219]. Se utilizaron distintas aproximaciones para determinar que el desarrollo del polen en este cultivar está ocurriendo entre las etapas E-L13 y E-L16 del sistema E-L. Con esta información, se procedió a evaluar la expresión relativa de los genes *VviZFP1*, *VviZFP3*, *VviZFP13*, *VviZFP30*, *VviZFP68*, *VviZFP81* y *VviZFP85*, presentando todos diferentes niveles de acumulación de transcritos durante el periodo del desarrollo floral evaluado. El contraste de los perfiles de expresión con la caracterización fenológica (del estado celular del contenido de anteras) de las etapas evaluadas colaboró para interpretar de mejor manera los resultados obtenidos. Posteriormente, se profundizó en la comprensión de dos *VviZDP* evaluando la actividad de su promotor mediante el ensayo de tinción histoquímica GUS, confirmando la expresión de *VviZFP13* y *VviZFP68* en granos de polen y en estigma para el caso específico de *VviZFP13*. Los análisis se complementaron con la caracterización de sus

regiones promotoras, identificando elementos de respuesta a genes homeóticos, regulación hormonal y elementos de expresión polen específicos. Toda esta información genera un marco de conocimiento respecto de la familia de *C2H2-ZFP* de la vid en general, además da luces sobre aquellos miembros con una putativa función en los eventos de desarrollo del polen (Figura 29).

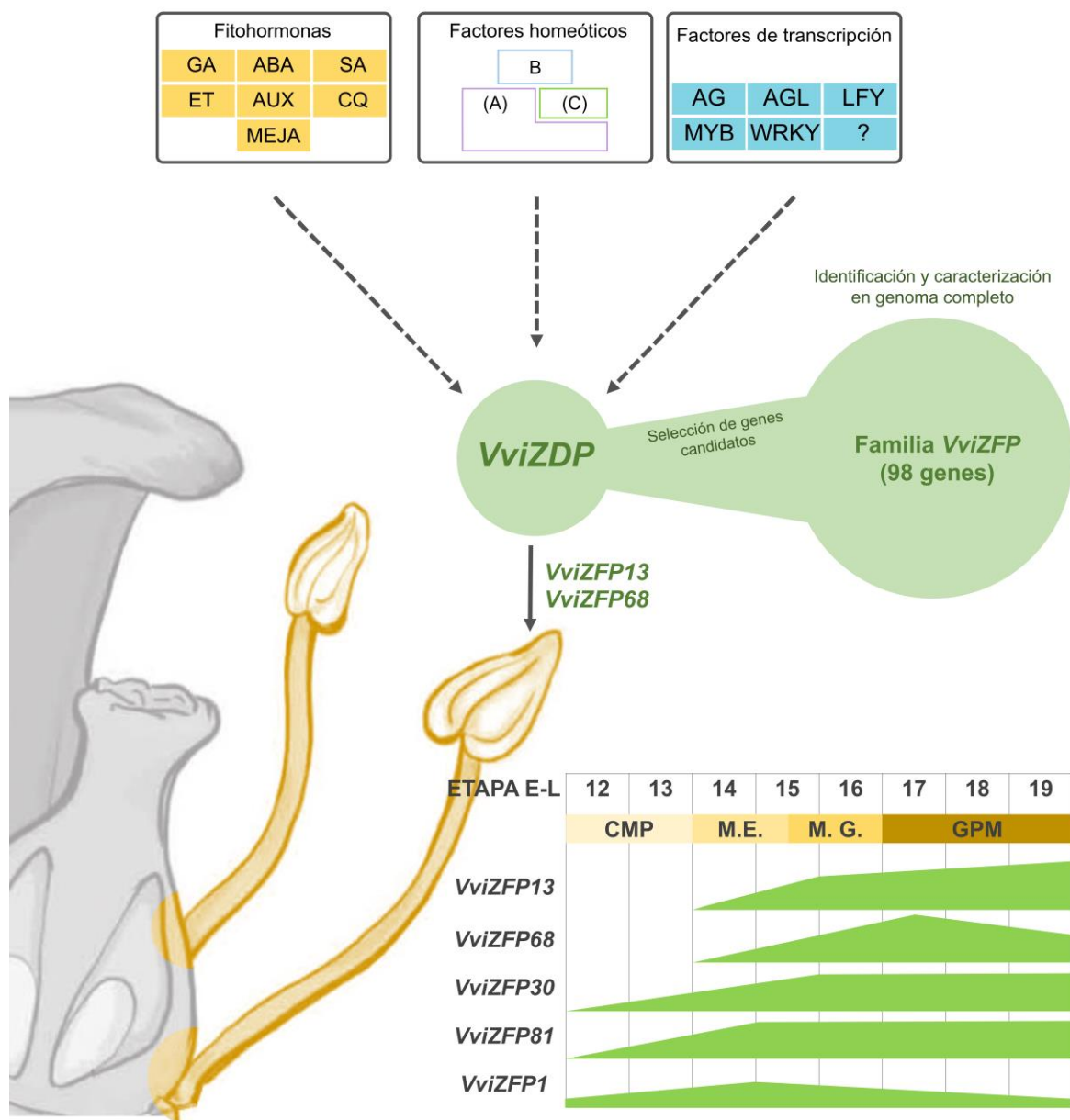


Figura 29. Regulación y expresión de genes *VviZDP*. Los genes *VviZFP* que participan en el desarrollo del polen (genes *VviZDP*) son un grupo de genes pertenecientes a la familia *VviZFP* de la vid. La expresión de los *VviZDP* es regulada por factores homeóticos, basados en el modelo (A)B(C), factores de transcripción y por elementos propios de las vías de regulación mediada por fitohormonas. Los perfiles de expresión de un grupo de *VviZFP* demuestran que estos genes están siendo transcritos durante los eventos clave del desarrollo del

polen. A su vez, la expresión de *VviZFP13* y *VviZFP68* permiten proponer a ambos genes como *VviZDP*. CMP, célula madre del polen; M.E., microesporogénesis; M.G., microgametogénesis; GPM, grano de polen maduro.

5. PROYECCIONES

Desde este trabajo de tesis quedan proyectadas varias actividades y nuevas hipótesis que conducen a comprender de mejor manera la participación de esta familia de genes en el desarrollo del polen. Debido a que la generación de conocimiento es dinámica, se han reportado otros *ZFP* relacionados al desarrollo floral que no fueron incluidos en la planificación de este trabajo de tesis o que por limitaciones técnicas no pudieron ser considerados.

Del grupo de genes *VviZDP* candidatos sería interesante continuar los estudios de caracterización de los genes y regiones promotoras de *VviZFP1*, *VviZFP30*, *VviZFP40* y *VviZFP80*.

Posteriormente, se proponen realizar ensayos de complementación de líneas mutantes para estos genes en otros modelos vegetales. Para *arabidopsis*, se disponen de recursos de líneas mutantes y mapeo de estas, las que pueden ser utilizadas en ensayos de complementación. Además, se dispone del sistema CRISPR/Cas9 como herramienta fundamental para ser usada en ensayos futuros.

Otra arista no evaluada en este trabajo de tesis es la participación de los genes *VviZDP* en las rutas de señalización mediadas por fitohormonas, lo que debe ser determinado en experimentos posteriores a este trabajo de tesis.

6. CONCLUSIONES GENERALES

- La familia de genes que codifica para *C2H2-ZFP* en la vid (Familia *VviZFP*) está compuesta por 98 genes distribuidos en los 19 cromosomas de su genoma. Un grupo de estos genes son regulados transcripcionalmente durante el desarrollo del polen.
- En el cultivar 'Carmenere', la especificación de CMPs es visible a partir del estadio 13 de la escala E-L y el polen maduro es visible a partir del estadio 16 de la escala E-L, lo que fue ratificado por análisis de expresión relativa mediante qRT-PCR de genes homeóticos y genes vinculados al desarrollo del polen.
- Los análisis de expresión génica, la identificación de elementos en *cis*, junto con la determinación de la actividad de los promotores de *VviZFP68* y *VviZFP13* muestran que ambos genes son regulados en células del gametofito masculino durante el momento en que se desarrolla el polen.

7. SUPLEMENTARIOS

7.1 Figuras Suplementarias

7.1.1 Figura Suplementaria 1. Parámetros utilizados en *codeml* para la comparación de secuencias por pares

7.1.2 Figura Suplementaria 2. Relación d_N/d_S entre sustituciones no sinónimas (d_N) y sinónimas (d_S). Relación d_N/d_S entre cada *VviZFP* y su(s) secuencia(s) paróloga(s) calculada usando el módulo PAL2NAL del software PAML.

7.1.3 Figura Suplementaria 3. Mapa de digestión de la región promotora de *VviZFP68* y posición de partidores utilizados en el estudio.

7.1.4 Figura Suplementaria 4. Mapa de digestión de la región promotora de *VviZFP13* y posición de partidores utilizados en el estudio.

7.1.5 Figura Suplementaria 5. Mapa del vector de expresión binaria pBI121.

7.1.6 Figura Suplementaria 6. Mapa del vector de expresión binaria pCAMBIA1303.

7.2 Tablas Suplementarias

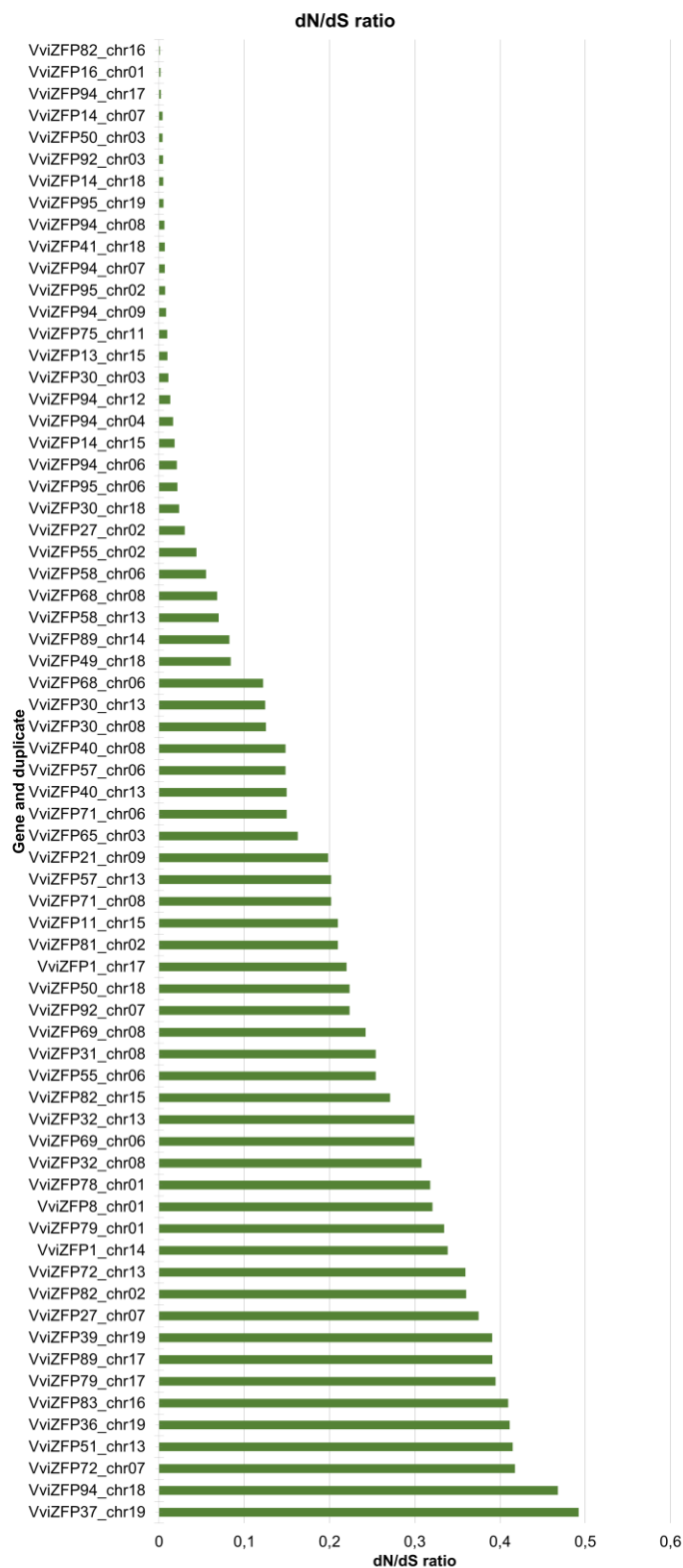
7.2.1 Tabla suplementaria 1: Términos de Ontología génica (GO) significativamente enriquecida en la familia de genes *VviZFP*.

7.1.1 Figura Suplementaria 1

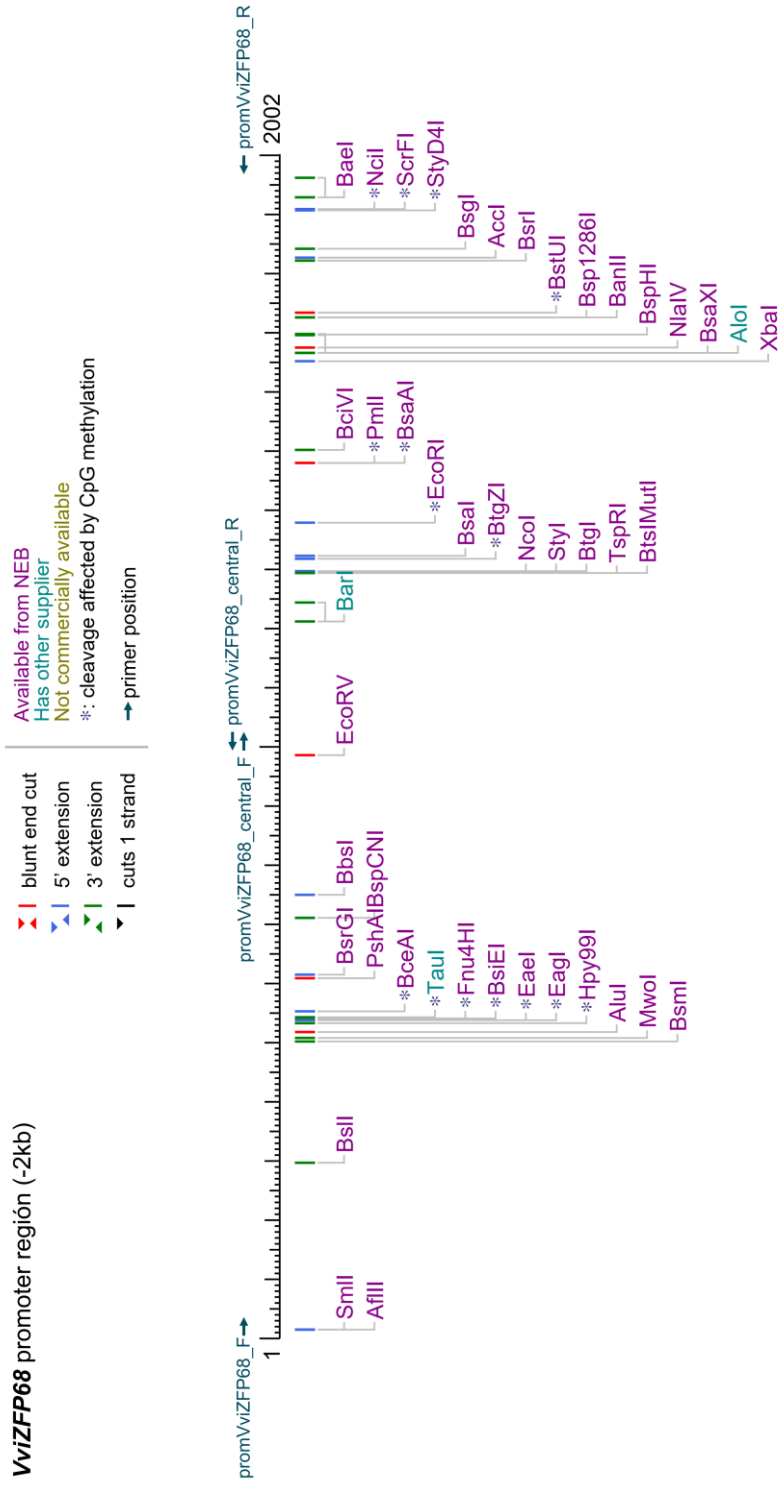
Parameters to *codeml*

noisy = 0 * 0,1,2,3,9: how much rubbish on the screen
verbose = 0 * 1: detailed output, 0: concise output
runmode = -2 * 0: user tree; 1: semi-automatic; 2: automatic *3: StepwiseAddition;
(4,5):PerturbationNNI; -2: pairwise
cleandata = 1 * "I added on 07/07/2004" Mikita Suyama
seqtype = 1 * 1:codons; 2:AAs; 3:codons-->AAs CodonFreq = 2 * 0:1/61 each, 1:F1X4, 2:F3X4,
3:codon table
model = 2 * models for codons: * 0:one, 1:b, 2:2 or more dN/dS ratios for branches
NSsites = 0 * dN/dS among sites. 0:no variation, 1:neutral, 2:positive
icode = 0 * 0:standard genetic code; 1:mammalian mt; 2-10:see below
Mgene = 0 * 0:rates, 1:separate; 2:pi, 3:kappa, 4:all
fix_kappa = 0 * 1: kappa fixed, 0: kappa to be estimated
kappa = 2 * initial or fixed kappa
fix_omega = 0 * 1: omega or omega_1 fixed, 0: estimate
omega = 1 * initial or fixed omega, for codons or codon-transltd AAs
fix_alpha = 1 * 0: estimate gamma shape parameter; 1: fix it at alpha
alpha = .0 * initial or fixed alpha, 0:infinity (constant rate)
Malpha = 0 * different alphas for genes
ncatG = 4 * # of categories in the dG or AdG models of rates
clock = 0 * 0: no clock, unrooted tree, 1: clock, rooted tree
getSE = 0 * 0: don't want them, 1: want S.E.s of estimates
RateAncestor = 0 * (1/0): rates (alpha>0) or ancestral states (alpha=0)
method = 0 * 0: simultaneous; 1: one branch at a time

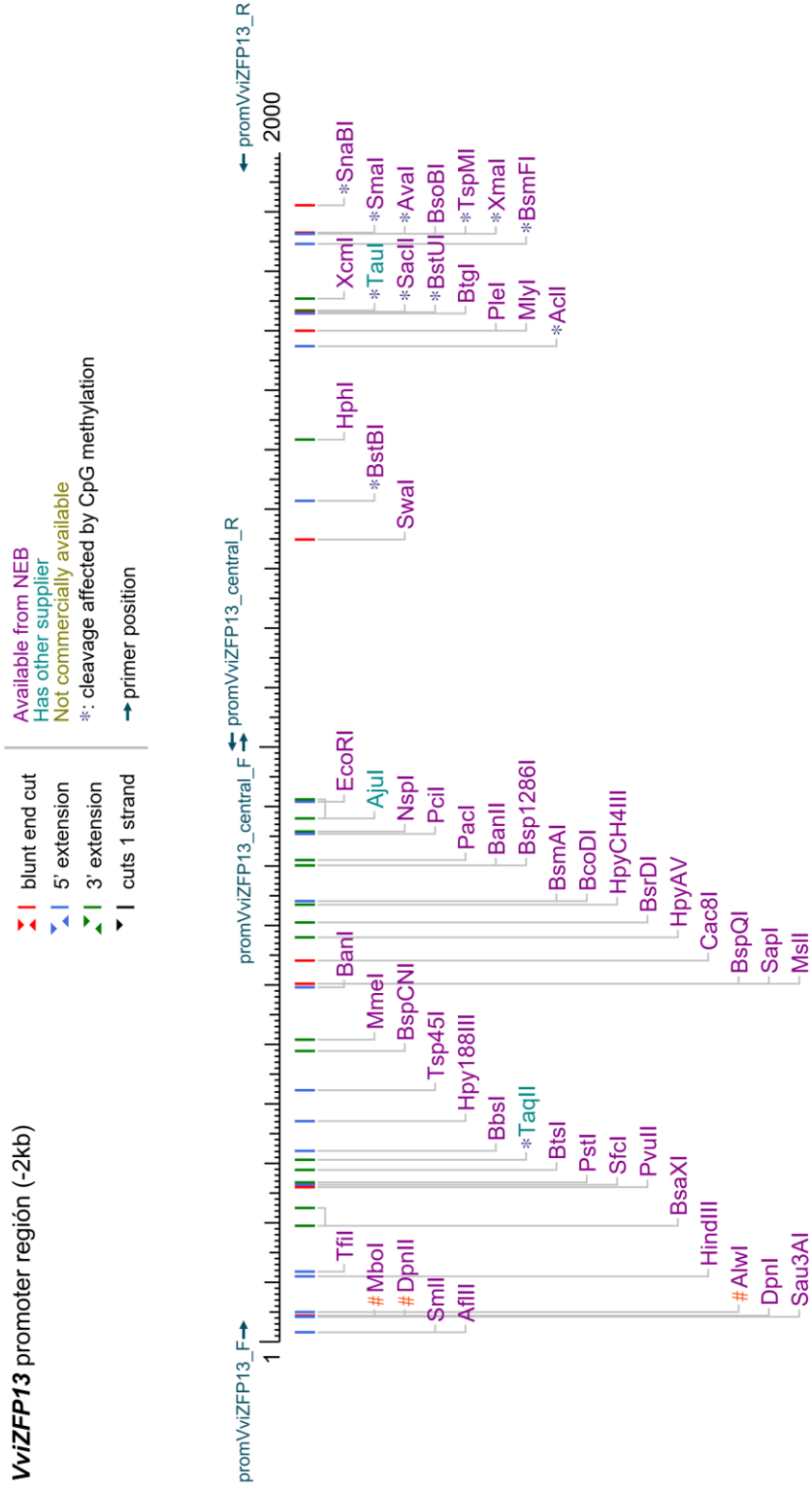
7.1.2 Figura Suplementaria 2



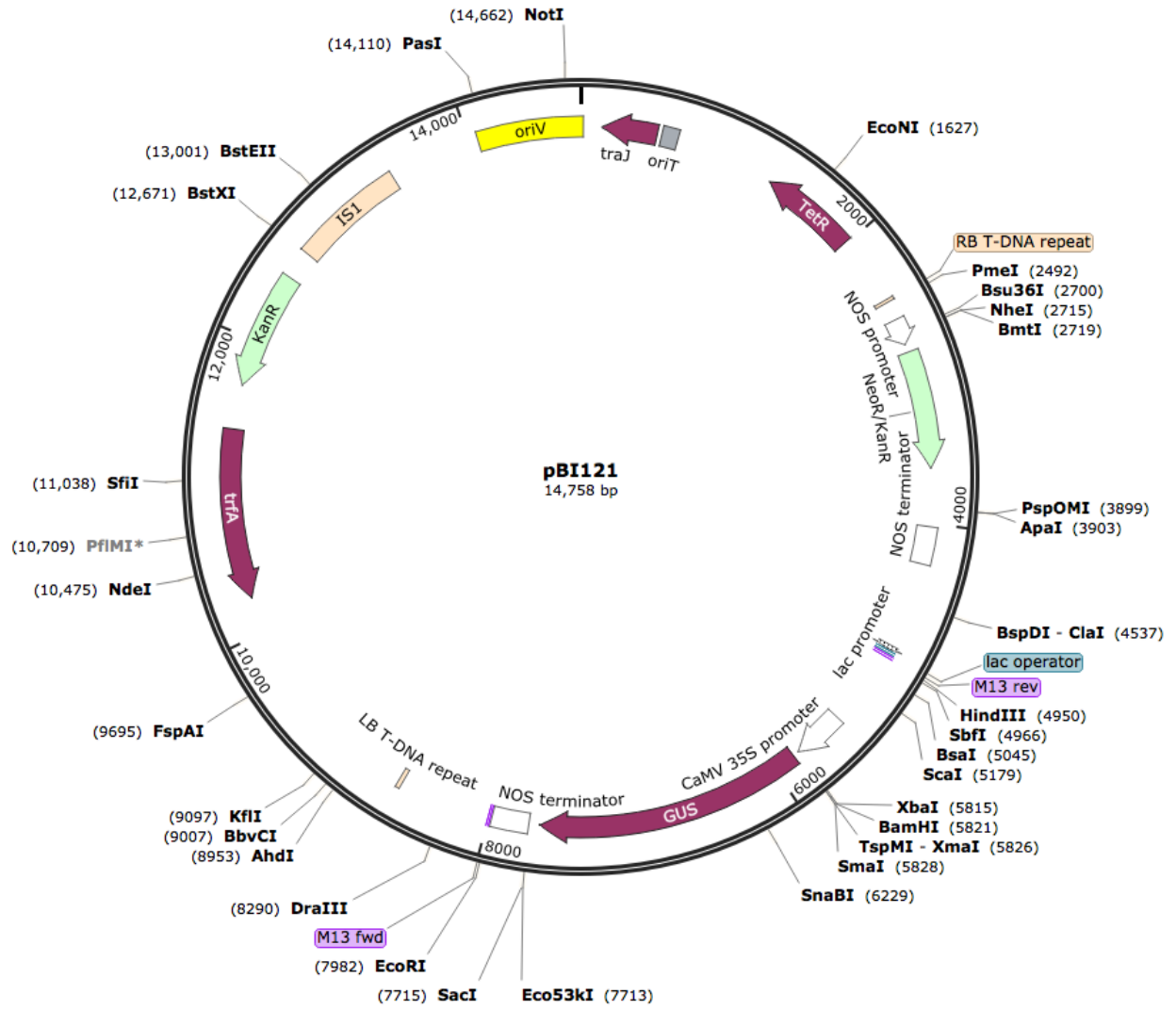
6.1.3 Figura Suplementaria 3



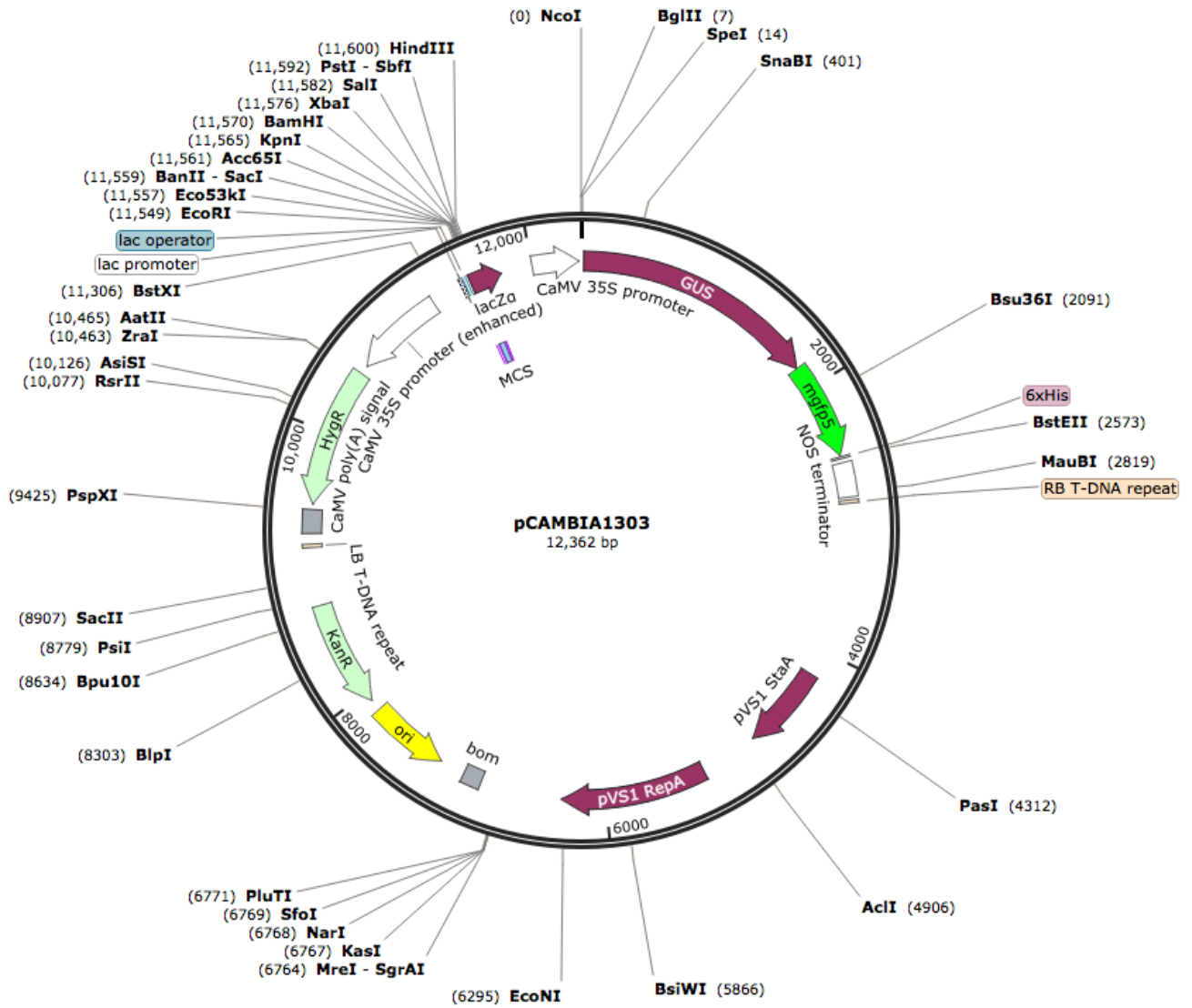
7.1.4 Figura Suplementaria 4



7.1.5 Figura Suplementaria 5



7.1.6 Figura Suplementaria 6



7.2.1 Tabla Suplementaria 1

GO Term	Ontology	Description	Number in input list	Number in BG/Ref	p-value	FDR
GO:2001141	BP	Regulation of RNA biosynthetic process	24	4626	5,5E-06	0,0013
GO:0006355	BP	Regulation of transcription, DNA-templated	24	4626	5,5E-06	0,0013
GO:1903506	BP	Regulation of nucleic acid-templated transcription	24	4626	5,5E-06	0,0013
GO:0048589	BP	Developmental growth	13	1740	3,1E-05	0,0023
GO:0097659	BP	Nucleic acid-templated transcription	24	5148	3,2E-05	0,0023
GO:0010556	BP	Regulation of macromolecule biosynthetic process	25	5489	3,1E-05	0,0023
GO:0006351	BP	Transcription, DNA-templated	24	5148	3,2E-05	0,0023
GO:0032774	BP	RNA biosynthetic process	24	5150	3,3E-05	0,0023
GO:0051252	BP	Regulation of RNA metabolic process	24	5067	2,5E-05	0,0023
GO:2000112	BP	Regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	25	5489	3,1E-05	0,0023
GO:0031326	BP	Regulation of cellular biosynthetic process	25	5616	4,6E-05	0,0027
GO:0010468	BP	Regulation of gene expression	25	5609	4,5E-05	0,0027
GO:0009889	BP	Regulation of biosynthetic process	25	5740	6,5E-05	0,0035
GO:0019219	BP	Regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	24	5390	6,8E-05	0,0035
GO:0042538	BP	Hyperosmotic salinity response	5	271	2,0E-04	0,0094
GO:0009860	BP	Pollen tube growth	6	433	2,1E-04	0,0094
GO:0060255	BP	Regulation of macromolecule metabolic process	27	6998	2,4E-04	0,01
GO:0080090	BP	Regulation of primary metabolic process	27	7053	2,7E-04	0,01
GO:0040007	BP	Growth	13	2162	2,7E-04	0,01
GO:0031323	BP	Regulation of cellular metabolic process	27	7149	3,4E-04	0,012
GO:0051171	BP	Regulation of nitrogen compound metabolic process	24	6107	4,5E-04	0,015
GO:0048868	BP	Pollen tube development	6	518	5,4E-04	0,018
GO:0044703	BP	Multi-organism reproductive process	10	1495	6,4E-04	0,02
GO:0030154	BP	Cell differentiation	13	2401	7,2E-04	0,021
GO:0009826	BP	Unidimensional cell growth	8	1007	7,7E-04	0,022
GO:0048869	BP	Cellular developmental process	15	3085	8,2E-04	0,023
GO:0019222	BP	Regulation of metabolic process	27	7585	8,7E-04	0,023
GO:0006972	BP	Hyperosmotic response	5	430	1,6E-03	0,039
GO:0010200	BP	Response to chitin	6	639	1,6E-03	0,039
GO:0009932	BP	Cell tip growth	6	661	1,9E-03	0,044
GO:0008270	MF	Zinc ion binding	98	4645	2,2E-96	1,4E-94
GO:0046914	MF	Transition metal ion binding	98	6640	6,4E-82	2E-80

7.2.1 Tabla Suplementaria 1. Continuación (2)

GO Term	Ontology	Description	Number in input list	Number in BG/Ref	p-value	FDR
GO:0046872	MF	Metal ion binding	98	9138	5,8E-69	1,2E-67
GO:0043169	MF	Cation binding	98	9602	6,0E-67	9,4E-66
GO:0043167	MF	Ion binding	98	10090	6,2E-65	7,8E-64
GO:0003676	MF	Nucleic acid binding	63	9863	1,4E-22	1,4E-21
GO:0005488	MF	Binding	98	31578	1,7E-18	1,6E-17
GO:1901363	MF	Heterocyclic compound binding	66	20082	1,2E-08	8,7E-08
GO:0097159	MF	Organic cyclic compound binding	66	20106	1,2E-08	8,7E-08
GO:0001071	MF	Nucleic acid binding transcription factor activity	16	1750	2,5E-07	0,0000014
GO:0003700	MF	Transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	16	1750	2,5E-07	0,0000014
GO:0042803	MF	Protein homodimerization activity	5	340	5,6E-04	0,0029
GO:0005622	CC	Intracellular	93	34574	3,4E-13	2E-11
GO:0044464	CC	Cell part	93	37480	4,9E-10	9,6E-09
GO:0005623	CC	Cell	93	37480	4,9E-10	9,6E-09
GO:0005667	CC	Transcription factor complex	16	1950	1,0E-06	0,000015

8. ANEXOS

8.1 Participación en reuniones científicas

8.1.1 Eventos Nacionales

- EVENTO** : XIII Reunión de Biología Vegetal
- FECHA** : 03-06 de diciembre de 2018
- TIPO DE PARTICIPACIÓN** : Presentación modalidad póster
- AUTORES** : **Oscar Arrey-Salas**, Enrique González
- TÍTULO** : Evaluation of grapevine *VviZFP67* as putative orthologous of *Petunia PhMEZ1*, a C2H2 zinc-finger protein gene coding involved in pollen development regulation
-
- EVENTO** : XIII Reunión de Biología Vegetal
- FECHA** : 03-06 de diciembre de 2018
- TIPO DE PARTICIPACIÓN** : Presentación modalidad póster
- AUTORES** : Ana Carolina Puentes-Romero, **Oscar Arrey-Salas**, Rubén Almada, Enrique González
- TÍTULO** : Analysis of microsporogenesis and involved genes in early stages of pollen development in *Vitis vinifera* cv. Carménère.
-
- EVENTO** : XII Reunión de Biología Vegetal
- FECHA** : 04-07 de diciembre de 2017
- TIPO DE PARTICIPACIÓN** : Presentación modalidad póster
- AUTORES** : **Oscar Arrey-Salas**, José Carlos Caris-Maldonado, Enrique González
- TÍTULO** : Uncovering C2H2 zinc-finger proteins in grapevine (*Vitis vinifera* L.). The gene family identification, phylogenetic relationships and expression profile reveal possibly participation in regulation of developmental processes
-
- EVENTO** : XI Reunión de Biología Vegetal
- FECHA** : 28 de noviembre al 01 de diciembre de 2016
- TIPO DE PARTICIPACIÓN** : Presentación modalidad póster
- AUTORES** : **Oscar Arrey-Salas**, Simón Ruiz-Lara, Enrique González
- TÍTULO** : Genome-wide identification, characterization and expression analysis of genes putatively Involved in pollen development in *Vitis vinifera*

EVENTO : X Reunión de Biología Vegetal
FECHA : 01-04 de diciembre de 2015
TIPO DE PARTICIPACIÓN : Presentación modalidad póster
AUTORES : **Oscar Arrey-Salas**, Enrique Gonzalez
TÍTULO : Zinc-finger transcription factors possibly involved in pollen development in *Vitis vinifera*

8.1.2 Eventos Internacionales

EVENTO : Plant Biology 2018
LUGAR : Montreal, Canadá
FECHA : 14-18 de julio de 2018
TIPO DE PARTICIPACIÓN : Presentación modalidad poster
AUTORES : **Oscar Arrey-Salas**, Jose-Carlos Caris-Maldonado, Bairon Hernandez, Enrique González
TÍTULO : Genome-wide identification and characterization of genes encoding C2H2 zinc-finger proteins from grapevine (*Vitis vinifera* L.). Selection and evaluation of *VviZFP* candidate genes associated to pollen development regulation

8.2 Artículos científicos publicados

Arrey-Salas, O.; Caris-Maldonado, J.C.; Hernández-Rojas, B.; Gonzalez, E. Comprehensive Genome-Wide Exploration of C2H2 Zinc Finger Family in Grapevine (*Vitis vinifera* L.): Insights into the Roles in the Pollen Development Regulation. *Genes* 2021, 12, 302. <https://doi.org/10.3390/genes12020302>

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carmona, M.J.; Chaïb, J.; Martínez-Zapater, J.M.; Thomas, M.R. A molecular genetic perspective of reproductive development in grapevine. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 2579–2596, doi:10.1093/jxb/ern160.
2. Iriti, M.; Faoro, F.; Agroalimentare, D. *Bioactive Chemicals and Health Benefits of Grapevine Products*; First Edit.; Elsevier Inc., 2010;
3. Huamán-Castilla, N.L.; Mariotti-Celis, M.S.; Pérez-Correa, J.R. Polyphenols of Carménère Grapes. *Mini. Rev. Org. Chem.* **2017**, *14*, 176–186, doi:10.2174/1570193X14666170206151439.
4. Hinrichsen, P.; Narváez, C.; Bowers, J.E.; Boursiquot, J.M.; Valenzuela, J.; Muñoz, C.; Meredith, C.P. Distinguishing Carmenère from Similar Cultivars by DNA Typing. **2001**, *4*, 396–399.
5. Pszczółkowski, P. La invención del cv. Carménère (*Vitis vinifera* L) en Chile, desde la mirada de uno de sus actores. *Rev. Universum* **2004**, *19*, 50–165, doi:http://dx.doi.org/10.4067/S0718-23762004000200010.
6. Alva, O.; Roa-Roco, R.N.; Pérez-Díaz, R.; Yáñez, M.; Tapia, J.; Moreno, Y.; Ruiz-Lara, S.; González, E. Pollen morphology and boron concentration in floral tissues as factors triggering natural and GA-induced parthenocarpic fruit development in grapevine. *PLoS One* **2015**, *10*, e0139503, doi:10.1371/journal.pone.0139503.
7. Royo, C.; Carbonell-Bejerano, P.; Torres-Pérez, R.; Nebish, A.; Martínez, Ó.; Rey, M.; Aroutiounian, R.; Ibáñez, J.; Martínez-Zapater, J.M. Developmental, transcriptome, and genetic alterations associated with parthenocarp in the grapevine seedless somatic variant Corinto blanco. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 259–273, doi:10.1093/jxb/erv452.
8. Perl, A.; Sahar, N.; Spiegel-Roy, P.; Gavish, S.; Elyasi, R.; Orr, E.; Bazak, H. Conventional and biotechnological approaches in breeding seedless table grapes. *Acta Hort.* 2000, *528*, 607–612.
9. Gorguet, B.; Van Heusden, A.W.; Lindhout, P. Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biol.* **2005**, *7*, 131–139, doi:10.1055/s-2005-837494.
10. Mulins, M.G.; Bouquet, A.; Williams, L.E. *Biology of the grapevine*; 1st ed.; Cambridge University Press: UK, 1992; ISBN 0521305071.
11. Keller, M. *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology*; 1st ed.; Academic Press: London, UK, 2010;
12. Shiozaki, S.; Zhuo, X.; Ogata, T.; Horiuchi, S. Involvement of polyamines in gibberellin-induced development of seedless grape berries. *Plant Growth Regul.* **1998**, *25*, 187–193.
13. Takatsujii, H. Zinc-finger proteins: The classical zinc finger emerges in contemporary plant science. *Plant Mol. Biol.* **1999**, *39*, 1073–1078, doi:10.1023/A:1006184519697.
14. Broadley, M.R.; White, P.J.; Hammond, J.P.; Zelko, I.; Lux, A. Zinc in plants. *New Phytol.* **2007**, *173*, 677–702, doi:10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x.
15. Abreu, I.; Costa, I.; Oliveira, M.; Cunha, M.; De Castro, R. Ultrastructure and germination of *Vitis vinifera* cv. Loureiro pollen. *Protoplasma* **2006**, *228*, 131–135, doi:10.1007/s00709-006-0167-1.
16. Gallardo, A.; Ocete, R.; López, M.Á.; Lara, M.; Rivera, D. Assessment of pollen dimorphism in populations of *Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi in Spain. *Vitis* **2009**, *48*, 59–62.
17. Boss, P.K.; Buckeridge, E.J.; Poole, A.; Thomas, M.R. New insights into grapevine flowering. *Funct. Plant Biol.* **2003**, *30*, 593–606, doi:10.1071/FP02112.
18. Thomson, B.; Wellmer, F. *Molecular regulation of flower development*; 1st ed.; Elsevier Inc., 2019; Vol. 131; ISBN 9780128098042.
19. Wils, C.R.; Kaufmann, K. Gene-regulatory networks controlling inflorescence and flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *95*–105, doi:10.1016/j.bbagr.2016.07.014.
20. Nag, A.; Jack, T. Sculpting the flower; the role of microRNAs in flower development. In *Current Topics in Developmental Biology*; 2010; Vol. 91, pp. 349–378.
21. Vachon, G.; Engelhorn, J.; Carles, C.C. Interactions between transcription factors and chromatin regulators in the control of flower development. *J. Exp. Bot.* **2018**, *69*, 2461–2471, doi:10.1093/jxb/ery079.
22. Moon, J.; Lee, H.; Kim, M.; Lee, I. Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **2005**, *46*, 292–299, doi:10.1093/pcp/pci024.
23. Bhatia, N.; Heisler, M.G. Self-organizing periodicity in development: Organ positioning in plants. *Dev.* **2018**, *145*, 1–11,

- doi:10.1242/dev.149336.
24. Yamaguchi, N.; Winter, C.M.; Wu, M.-F.; Kanno, Y.; Yamaguchi, A.; Seo, M.; Wagner, D. Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in Arabidopsis. *Science (80-.)*. **2014**, *344*, 638–641.
 25. William, D.; Su, Y.; Smith, M.R.; Lu, M.; Baldwin, D.A.; Wagner, D. Genomic identification of direct target genes of LEAFY. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 1775–1780, doi:doi.org/10.1073/pnas.0307842100.
 26. Haughn, G.W.; Somerville, C.R. Genetic control of morphogenesis in Arabidopsis. *Dev. Biol.* **1988**, *9*, 73–89, doi:doi.org/10.1002/dvg.1020090202.
 27. Schwarz-Sommer, Z.; Huijser, P.; Nacken, W.; Saedler, H.; Sommer, H. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science (80-.)*. **1990**, *250*, 931–936, doi:10.1126/science.250.4983.931.
 28. Causier, B.; Schwarz-Sommer, Z.; Davies, B. Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2010**, *21*, 73–79, doi:10.1016/j.semcdb.2009.10.005.
 29. Litt, A.; Kramer, E.M. The ABC model and the diversification of floral organ identity. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2010**, *21*, 129–137.
 30. Rijpkema, A.S.; Vandenbussche, M.; Koes, R.; Heijmans, K.; Gerats, T. Variations on a theme: Changes in the floral ABCs in angiosperms. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2010**, *21*, 100–107, doi:10.1016/j.semcdb.2009.11.002.
 31. Wellmer, F.; Graciet, E.; Riechmann, J.L. Specification of floral organs in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 1–9, doi:10.1093/jxb/ert385.
 32. Wu, F.; Shi, X.; Lin, X.; Liu, Y.; Chong, K.; Theißen, G.; Meng, Z. The ABCs of flower development: mutational analysis of API/FUL-like genes in rice provides evidence for a homeotic (A)-function in grasses. *Plant J.* **2017**, *89*, 310–324, doi:10.1111/tpj.13386.
 33. Theißen, G.; Melzer, R.; Ruümpler, F. MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: Linking plant development and evolution. *Development* **2016**, *143*, 3259–3271, doi:10.1242/dev.134080.
 34. Heijmans, K.; Ament, K.; Rijpkema, A.S.; Zethof, J.; Wolters-Arts, M.; Gerats, T.; Vandenbussche, M. Redefining C and D in the petunia ABC. *Plant Cell* **2012**, *24*, 2305–2317, doi:10.1105/tpc.112.097030.
 35. Pinyopich, A.; Ditta, G.S.; Savidge, B.; Liljegren, S.J.; Baumann, E.; Wisman, E.; Yanofsky, M.F. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* **2003**, *424*, 85–88, doi:10.1038/nature01741.
 36. Mullins, M.G.; Bouquet, A.; Williams, L.E. *Biology of the Grapevine*; Cambridge University Press: Cambridge, Reino Unido, 1992;
 37. Noriega, X.; Burgos, B.; Pérez, F.J. Short day-photoperiod triggers and low temperatures increase expression of peroxidase RNA transcripts and basic peroxidase isoenzyme activity in grapevine buds. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1376–1383, doi:10.1016/j.phytochem.2007.02.003.
 38. Sreekantan, L.; Thomas, M.R. VvFT and VvMADS8, the grapevine homologues of the floral integrators FT and SOC1, have unique expression patterns in grapevine and hasten flowering in Arabidopsis. *Funct. Plant Biol.* **2006**, *33*, 1129–1139, doi:10.1071/FP06144.
 39. Heazlewood, J.E.; Wilson, S. Anthesis, pollination and fruitset in Pinot Noir. *Vitis* **2004**, *43*, 65–68.
 40. Vasconcelos, M.C.; Greven, M.; Winefield, C.S.; Trought, M.C.T.; Raw, V. The flowering process of *Vitis vinifera*: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2009**, *60*, 411–434.
 41. Almada, R.; Cabrera, N.; Casaretto, J.A.; Ruiz-lara, S.; Gonzalez Villanueva, E. VvCO and VvCOL1, two CONSTANS homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds. *Plant Cell Rep.* **2009**, *28*, 1193–1203, doi:10.1007/s00299-009-0720-4.
 42. Calonje, M.; Cubas, P.; Martínez-Zapater, J.M.; Carmona, M.J. Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1491–1501, doi:10.1104/pp.104.040832.et.
 43. Carmona, M.J.; Cubas, P.; Martínez-Zapater, J.M. VFL, the Grapevine FLORICAULA / LEAFY Ortholog, Is Expressed in Meristematic Regions Independently of Their Fate. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 68–77, doi:10.1104/pp.002428.
 44. Carmona, M.J.; Cubas, P.; Calonje, M.; Martínez-Zapater, J.M. Flowering transition in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Can. J. Bot.* **2007**, *85*, 701–711, doi:10.1139/B07-059.

45. Poupin, M.J.; Federici, F.; Medina, C.; Matus, J.T.; Timmermann, T.; Arce-Johnson, P. Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box TM6, PISTILLATA and APETALA3 genes which are differentially expressed during flower and fruit development. *Gene* **2007**, *404*, 10–24, doi:10.1016/j.gene.2007.08.005.
46. Horvath, D. Common mechanisms regulate flowering and dormancy. *Plant Sci.* **2009**, *177*, 523–531, doi:10.1016/j.plantsci.2009.09.002.
47. Almada, R.; Cabrera, N.; Casaretto, J.A.; Peña-Cortés, H.; Ruiz-Lara, S.; Villanueva, E.G. Epigenetic repressor-like genes are differentially regulated during grapevine (*Vitis vinifera* L.) development. *Plant Cell Rep.* **2011**, *30*, 1959–1968, doi:10.1007/s00299-011-1104-0.
48. Grimplet, J.; Adam-Blondon, A.-F.; Bert, P.-F.; Bitz, O.; Cantu, D.; Davies, C.; Delrot, S.; Pezzotti, M.; Rombauts, S.; Cramer, G.R. The grapevine gene nomenclature system. *BMC Genomics* **2014**, *15*, 1077, doi:10.1186/1471-2164-15-1077.
49. Boss, P.K.; Vivier, M.; Matsumoto, S.; Dry, I.B.; Thomas, M.R. 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.* **2001**, *45*, 541–553, doi:10.1023/A:1010634132156.
50. Boss, P.K.; Sensi, E.; Hua, C.; Davies, C.; Thomas, M.R. Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Sci.* **2002**, *162*, 887–895, doi:10.1016/S0168-9452(02)00034-1.
51. Thomson, B.; Zheng, B.; Wellmer, F. Floral organogenesis: When knowing your ABCs is not enough. *Plant Physiol.* **2017**, *173*, 56–64, doi:10.1104/pp.16.01288.
52. Ryan, P.T.; Ó'Maoiléidigh, D.S.; Drost, H.-G.; Kwaśniewska, K.; Gabel, A.; Grosse, I.; Graciet, E.; Quint, M.; Wellmer, F. Patterns of gene expression during Arabidopsis flower development from the time of initiation to maturation. *BMC Genomics* **2015**, *16*, 488, doi:10.1186/s12864-015-1699-6.
53. Loraine, A.E.; McCormick, S.; Estrada, A.; Patel, K.; Qin, P. RNA-seq of Arabidopsis pollen uncovers novel transcription and alternative splicing. *Plant Physiol.* **2013**, *162*, 1092–1109, doi:10.1104/pp.112.211441.
54. Honys, D.; Twell, D. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis. *Genome Biol.* **2004**, *5*, R85.1–R.85.13, doi:10.1186/gb-2004-5-11-r85.
55. Moreau, F.; Thévenon, E.; Blanvillain, R.; Lopez-Vidriero, I.; Franco-Zorrilla, J.M.; Dumas, R.; Parcy, F.; Morel, P.; Trehin, C.; Carles, C.C. The Myb-domain protein ULTRAPETALA1 INTERACTING FACTOR 1 controls floral meristem activities in Arabidopsis. *Development* **2016**, *143*, 1108–1119, doi:10.1242/dev.127365.
56. Sharma, N.; Xin, R.; Kim, D.H.; Sung, S.; Lange, T.; Huq, E. NO FLOWERING IN SHORT DAY (NFL) is a bHLH transcription factor that promotes flowering specifically under short-day conditions in Arabidopsis. *Development* **2016**, *143*, 682–690, doi:10.1242/dev.128595.
57. Prunet, N.; Yang, W.; Das, P.; Meyerowitz, E.M.; Jack, T.P. SUPERMAN prevents class B gene expression and promotes stem cell termination in the fourth whorl of Arabidopsis thaliana flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114*, 7166–7171, doi:10.1073/pnas.1705977114.
58. Lyu, T.; Cao, J. Cys2/His2 Zinc-finger proteins in transcriptional regulation of flower development. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2589, doi:10.3390/ijms19092589.
59. Tupler, R.; Perini, G.; Green, M.R. Expressing the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 832–833, doi:10.1038/35057011.
60. Englbrecht, C.C.; Schoof, H.; Böhm, S. Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the Arabidopsis thaliana genome. *BMC Genomics* **2004**, *5*, 39, doi:10.1186/1471-2164-5-39.
61. Englbrecht, C.C.; Schoof, H.; Böhm, S. Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the Arabidopsis thaliana genome. *BMC Genomics* **2004**, *5*, 39, doi:10.1186/1471-2164-5-39.
62. Liu, Q.; Wang, Z.; Xu, X.; Zhang, H.; Li, C. Genome-wide analysis of C2H2 zinc-finger family transcription factors and their responses to abiotic stresses in poplar (*Populus trichocarpa*). *PLoS One* **2015**, *10*, e0134753, doi:10.1371/journal.pone.0134753.
63. Lam, K.N.; Bakel, H. Van; Cote, A.G.; Ven, A. Van Der; Hughes, T.R. Sequence specificity is obtained from the majority of modular C2H2 zinc-finger arrays. **2011**, *39*, 4680–4690, doi:10.1093/nar/gkq1303.
64. Enuameh, M.S.; Asriyan, Y.; Richards, A.; Christensen, R.G.; Hall, V.L.; Kazemian, M.; Zhu, C.; Pham, H.; Cheng, Q.; Blatti,

- C.; et al. Global analysis of *Drosophila* Cys 2 -His 2 zinc finger proteins reveals a multitude of novel recognition motifs and binding determinants. **2013**, 928–940, doi:10.1101/gr.151472.112.928.
65. Persikov, A. V.; Wetzel, J.L.; Rowland, E.F.; Oakes, B.L.; Xu, D.J.; Singh, M.; Noyes, M.B. NAR Breakthrough Article A systematic survey of the Cys 2 His 2 zinc finger DNA-binding landscape. **2015**, 43, 1965–1984, doi:10.1093/nar/gku1395.
 66. Wolfe, S.A.; Nekludova, L.; Pabo, C.O. DNA recognition by Cys2His2 Zinc Finger Proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 3, 183–212.
 67. Kubo, K.I.; Sakamoto, A.; Kobayashi, A.; Rybka, Z.; Kanno, Y.; Nakagawa, H.; Nishino, T.; Takatsuji, H. CYS2/His2 zinc-finger protein family of petunia: Evolution and general mechanism of target-sequence recognition. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 608–615, doi:10.1093/nar/26.2.608.
 68. Kobayashi, A.; Sakamoto, A.; Kubo, K.; Rybka, Z.; Kanno, Y.; Takatsuji, H. Seven zinc-finger transcription factors are expressed sequentially during the development of anthers in petunia. *Plant J.* **1998**, 13, 571–576, doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00043.x.
 69. Takatsuji, H. Zinc-finger transcription factors in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, 54, 582–596, doi:10.1007/s000180050186.
 70. Agarwal, P.; Arora, R.; Ray, S.; Singh, A.K.; Singh, V.P.; Takatsuji, H.; Kapoor, S.; Tyagi, A.K. Genome-wide identification of C2H2 zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant Mol. Biol.* **2007**, 65, 467–485, doi:10.1007/s1103-007-9199-y.
 71. Ohta, M.; Matsui, K.; Hiratsu, K.; Shinshi, H.; Ohme-Takagi, M. Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **2001**, 13, 1959–1968, doi:10.1105/TPC.010127.
 72. Kagale, S.; Links, M.G.; Rozwadowski, K. Genome-Wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2010**, 152, 1109–1134, doi:10.1104/pp.109.151704.
 73. Hiratsu, K.; Mitsuda, N.; Matsui, K.; Ohme-takagi, M. Identification of the minimal repression domain of SUPERMAN shows that the DLELRL hexapeptide is both necessary and sufficient for repression of transcription in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 321, 172–178, doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.115.
 74. Tsukagoshi, H.; Saijo, T.; Shibata, D.; Morikami, A.; Nakamura, K. Analysis of a sugar response mutant of Arabidopsis identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiol.* **2005**, 138, 675–685, doi:10.1104/pp.104.057752.1.
 75. Mittler, R.; Kim, Y.; Song, L.; Coutu, J.; Coutu, A.; Ciftci-Yilmaz, S.; Lee, H.; Stevenson, B.; Zhu, J.K. Gain- and loss-of-function mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Lett.* **2006**, 580, 6537–6542, doi:10.1016/j.febslet.2006.11.002.
 76. Liu, X.; An, J.; Han, H.J.; Kim, S.H.; Lim, C.O.; Yun, D.-J.; Chung, W.S. ZAT11, a zinc finger transcription factor, is a negative regulator of nickel ion tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* **2014**, 33, 2015–2021, doi:10.1007/s00299-014-1675-7.
 77. Borg, M.; Rutley, N.; Kagale, S.; Hamamura, Y.; Gherghinoiu, M.; Kumar, S.; Sari, U.; Esparza-Franco, M.A.; Sakamoto, W.; Rozwadowski, K.; et al. An EAR-Dependent regulatory module promotes male germ cell division and sperm fertility in Arabidopsis. *Plant Cell* **2014**, 26, 2098–2113, doi:10.1105/tpc.114.124743.
 78. Canaguier, A.; Grimplet, J.; Di Gaspero, G.; Scalabrin, S.; Duchêne, E.; Choisne, N.; Mohellibi, N.; Guichard, C.; Rombauts, S.; Le Clainche, I.; et al. A new version of the grapevine reference genome assembly (12X.v2) and of its annotation (VCost.v3). *Genomics Data* **2017**, 14, 56–62, doi:10.1016/j.gdata.2017.09.002.
 79. Eddy, S.R. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* **1998**, 14, 755–763, doi:10.1093/bioinformatics/14.9.755.
 80. Bateman, A.; Coin, L.; Durbin, R.; Finn, R.D.; Hollich, V.; Griffiths-Jones, S.; Khanna, A.; Marshall, M.; Moxon, S.; Sonnhammer, E.L.L.; et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, doi:10.1093/nar/gkh121.
 81. Letunic, I.; Bork, P. 20 years of the SMART protein domain annotation. *Nucleic Acids Res.* **2018**, 46, D493–D496, doi:10.1093/nar/gkx922.
 82. Jones, P.; Binns, D.; Chang, H.; Fraser, M.; Li, W.; Mcanulla, C.; Mcwilliam, H.; Maslen, J.; Mitchell, A.; Nuka, G.; et al.

- InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1236–1240, doi:10.1093/bioinformatics/btu031.
83. Hao, Z.; Lv, D.; Ge, Y.; Shi, J.; Weijers, D.; Yu, G.; Chen, J. Rldeogram: Drawing SVG graphics to visualize and map genome-wide data on the idiograms. *PeerJ Comput. Sci.* **2020**, *6*, 1–11, doi:10.7717/peerj-cs.251.
 84. Hu, B.; Jin, J.; Guo, A.; Zhang, H.; Luo, J.; Gao, G. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 1296–1297, doi:10.1093/bioinformatics/btu817.
 85. Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T.J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, doi:10.1038/msb.2011.75.
 86. Sievers, F.; Higgins, D.G. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* **2018**, *27*, 135–145, doi:10.1002/pro.3290.
 87. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Niyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549, doi:10.1093/molbev/msy096.
 88. Saitou, N.; Nei, M. The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425, doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
 89. Yu, C.-S.; Chen, Y.-C.; Lu, C.-H.; Hwang, J.-K. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2006**, *64*, 643–651, doi:10.1002/prot.21018.
 90. Kosugi, S.; Hasebe, M.; Tomita, M.; Yanagawa, H. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 10171–10176, doi:10.1073/pnas.0900604106.
 91. Bailey, T.L.; Boden, M.; Buske, F.A.; Frith, M.; Grant, C.E.; Clementi, L.; Ren, J.; Li, W.W.; Noble, W.S. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 202–208, doi:10.1093/nar/gkp335.
 92. Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.R.; Appel, R.D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*; Walker, J.M., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2005; pp. 571–607.
 93. Brown, N.P.; Leroy, C.; Sander, C. MView: a web-compatible database search or multiple alignment viewer. *Bioinformatics* **1998**, *14*, 380–381, doi:https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.4.380.
 94. Rizzon, C.; Ponger, L.; Gaut, B.S. Striking similarities in the genomic distribution of tandemly arrayed genes in Arabidopsis and rice. *PLoS Comput. Biol.* **2006**, *2*, doi:10.1371/journal.pcbi.0020115.
 95. Sun, H.; Fan, H.; Ling, H. Genome-wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato. *BMC Genomics* **2015**, *16*, 9, doi:10.1186/s12864-014-1209-2.
 96. Krzywinski, M.; Schein, J.; Birol, I.; Connors, J.; Gascoyne, R.; Horsman, D.; Jones, S.J.; Marra, M.A. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* **2009**, *19*, 1639–1645, doi:10.1101/gr.092759.109.19.
 97. Guo, C.; Guo, R.; Xu, X.; Gao, M.; Li, X.; Song, J.; Zheng, Y.; Wang, X. Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 1513–1528, doi:10.1093/jxb/eru007.
 98. Yang, Z. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. **2007**, *24*, 1586–1591, doi:10.1093/molbev/msm088.
 99. Suyama, M.; Torrents, D.; Bork, P. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W609–W612, doi:10.1093/nar/gkl315.
 100. Tian, T.; Liu, Y.; Yan, H.; You, Q.; Yi, X.; Du, Z.; Xu, W.; Su, Z. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W122–W129, doi:10.1093/nar/gkx382.
 101. Fasoli, M.; Dal Santo, S.; Zenoni, S.; Torielli, G.B.; Farina, L.; Zamboni, A.; Porceddu, A.; Venturini, L.; Bicego, M.; Murino, V.; et al. The Grapevine expression atlas reveals a deep transcriptome shift driving the entire plant into a maturation program. *Plant Cell* **2012**, *24*, 3489–3505, doi:10.1105/tpc.112.100230.
 102. Cheadle, C.; Vawter, M.P.; Freed, W.J.; Becker, K.G. Analysis of microarray data using Z score transformation. *J. Mol. Diagnostics* **2003**, *5*, 73–81, doi:10.1016/S1525-1578(10)60455-2.
 103. Saeed, A.I.; Sharov, V.; White, J.; Li, J.; Liang, W.; Bhagabati, N.; Braisted, J.; Klapa, M.; Currier, T.; Thiagarajan, M.; et al. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **2003**, *34*, 374–378, doi:10.2144/03342mt01.

104. Arrey-Salas, O.; Caris-Maldonado, J.C.; Hernández-Rojas, B.; Gonzalez, E. Comprehensive genome-wide exploration of c2h2 zinc finger family in grapevine (*Vitis vinifera* L.): Insights into the roles in the pollen development regulation. *Genes (Basel)*. **2021**, *12*, 1–24, doi:10.3390/genes12020302.
105. Mathieu, O.; Yukawa, Y.; Prieto, J.L.; Vaillant, I.; Sugiura, M.; Tourmente, S. Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2424–2433, doi:10.1093/nar/gkg335.
106. Noh, B.; Lee, S.-H.; Kim, H.-J.; Yi, G.; Shin, E.-A.; Lee, M.; Jung, K.-J.; Doyle, M.R.; Amasino, R.M.; Noh, Y.-S. Divergent roles of a pair of homologous Jumonji/Zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of *Arabidopsis* flowering time. *Plant Cell Online* **2004**, *16*, 2601–2613, doi:10.1105/tpc.104.025353.
107. Klose, R.J.; Kallin, E.M.; Zhang, Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 715–727, doi:10.1038/nrg1945.
108. Antunez-Sanchez, J.; Naish, M.; Ramirez-Prado, J.S.; Ohno, S.; Huang, Y.; Dawson, A.; Opasathian, K.; Manza-Mianza, D.; Ariel, F.; Raynaud, C.; et al. A new role for histone demethylases in the maintenance of plant genome integrity. *Elife* **2020**, *9*, 1–32, doi:10.7554/eLife.58533.
109. Lu, F.; Cui, X.; Zhang, S.; Jenuwein, T.; Cao, X. *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 715–719, doi:10.1038/ng.854.
110. Roldán-Arjona, T.; Ariza, R.R.; Córdoba-Cañero, D. DNA Base Excision Repair in Plants: An Unfolding Story With Familiar and Novel Characters. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fpls.2019.01055.
111. Han, Y.; Zhang, A.; Huang, L.; Yu, X.; Yang, K.; Fan, S.; Cao, J. BcMF20, a putative pollen-specific transcription factor from *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Mol. Biol. Rep.* **2011**, *38*, 5321–5325, doi:10.1007/s11033-011-0682-9.
112. Kubo, K.; Kanno, Y.; Nishino, T.; Takatsuji, H. Zinc-finger genes that specifically express in pistil secretory tissues of *Petunia*. *Plant Cell Physiol.* **2000**, *41*, 377–382, doi:https://doi.org/10.1093/pcp/41.3.377.
113. Amaral, P.P.; Leonardi, T.; Han, N.; Viré, E.; Gascoigne, D.K.; Arias-Carrasco, R.; Büscher, M.; Pandolfini, L.; Zhang, A.; Pluchino, S.; et al. Genomic positional conservation identifies topological anchor point RNAs linked to developmental loci. *Genome Biol.* **2018**, *19*, 1–24, doi:10.1186/s13059-018-1405-5.
114. Kapoor, S.; Takatsuji, H. Silencing of an anther-specific zinc-finger gene, MEZ1, causes aberrant meiosis and pollen abortion in *petunia*. *Plant Mol. Biol.* **2006**, *61*, 415–430, doi:10.1007/s11103-006-0020-0.
115. Cui, D.; Zhao, J.; Jing, Y.; Fan, M.; Liu, J.; Wang, Z.; Xin, W.; Hu, Y. The *Arabidopsis* IDD14, IDD15, and IDD16 Cooperatively Regulate Lateral Organ Morphogenesis and Gravitropism by Promoting Auxin Biosynthesis and Transport. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, doi:10.1371/journal.pgen.1003759.
116. Yun, J.; Weigel, D.; Lee, I. Ectopic expression of SUPERMAN suppresses development of petals and stamens. *Plant Cell Physiol.* **2002**, *43*, 52–57.
117. Devaiah, B.N.; Nagarajan, V.K.; Raghothama, K.G. Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiol.* **2007**, *145*, 147–159, doi:10.1104/pp.107.101691.
118. Hu, W.; Ma, H. Characterization of a novel putative zinc finger gene MIF1: Involvement in multiple hormonal regulation of *Arabidopsis* development. *Plant J.* **2006**, *45*, 399–422, doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02626.x.
119. Sugano, S.; Kaminaka, H.; Rybka, Z.; Catala, R.; Salinas, J.; Matsui, K.; Ohme-Takagi, M.; Takatsuji, H. Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in *petunia*. *Plant J.* **2003**, *36*, 830–841, doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01924.x.
120. Luo, X.; Bai, X.; Zhu, D.; Li, Y.; Ji, W.; Cai, H.; Wu, J.; Liu, B.; Zhu, Y. GsZFP1, a new Cys2/His2-type zinc-finger protein, is a positive regulator of plant tolerance to cold and drought stress. *Planta* **2012**, *235*, 1141–1155, doi:10.1007/s00425-011-1563-0.
121. Agarwal, P.; Arora, R.; Ray, S.; Singh, A.K.; Singh, V.P.; Takatsuji, H.; Kapoor, S.; Tyagi, A.K. Genome-wide identification of C2H2 zinc-finger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis. *Plant Mol. Biol.* **2007**, *65*, 467–485, doi:10.1007/s11103-007-9199-y.
122. Gourcilleau, D.; Lenne, C.; Armenise, C.; Moulia, B.; Julien, J.L.; Bronner, G.; Leblanc-Fournier, N. Phylogenetic study of plant Q-type C2H2 zinc finger proteins and expression analysis of poplar genes in response to osmotic, cold and

- mechanical stresses. *DNA Res.* **2011**, *18*, 77–92, doi:10.1093/dnares/dsr001.
123. Muthamilarasan, M.; Bonthala, V.S.; Mishra, A.K.; Khandelwal, R.; Khan, Y.; Roy, R.; Prasad, M. C2H2 type of zinc finger transcription factors in foxtail millet define response to abiotic stresses. *Funct. Integr. Genomics* **2014**, *14*, 531–543, doi:10.1007/s10142-014-0383-2.
 124. Wei, K.; Pan, S.; Li, Y. Functional characterization of maize C2H2 Zinc-Finger gene family. *Plant Mol. Biol. Report.* **2016**, *34*, 761–776, doi:10.1007/s11105-015-0958-7.
 125. Minglei, Y.; Jiangtao, C.; Dawei, W.; Junhua, H.; Hua, W.; Daping, G.; Guanshan, L. Genome-wide identification and expression profiling of the C2H2-type zinc finger protein transcription factor family in tobacco. *Yi Chuan* **2016**, *38*, 337–349, doi:10.16288/j.ycz.15-440.
 126. Yuan, S.; Li, X.; Li, R.; Wang, L.; Zhang, C.; Chen, L.; Hao, Q.; Zhang, X.; Chen, H.; Shan, Z.; et al. Genome-wide identification and classification of soybean C2H2 zinc finger proteins and their expression analysis in legume-Rhizobium symbiosis. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fmicb.2018.00126.
 127. Alam, I.; Batool, K.; Cui, D.; Yang, Y.; Lu, Y. Comprehensive genomic survey, structural classification and expression analysis of C2H2 zinc finger protein gene family in Brassica rapa L. *PLoS One* **2019**, *14*, 1–22, doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216071 May.
 128. He, P.; Yang, Y.; Wang, Z.; Zhao, P.; Yuan, Y.; Zhang, L.; Ma, Y.; Pang, C.; Yu, J.; Xiao, G. Comprehensive analyses of ZFP gene family and characterization of expression profiles during plant hormone response in cotton. *BMC Plant Biol.* **2019**, *19*, 1–13, doi:10.1186/s12870-019-1932-6.
 129. Salih, H.; Odongo, M.R.; Gong, W.; He, S.; Du, X. Genome-wide analysis of cotton C2H2-zinc finger transcription factor family and their expression analysis during fiber development. *BMC Plant Biol.* **2019**, *19*, 1–17, doi:10.1186/s12870-019-2003-8.
 130. Jin, J.; Tian, F.; Yang, D.; Meng, Y.; Kong, L.; Luo, J.; Gao, G. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 1040–1045, doi:10.1093/nar/gkw982.
 131. Taylor, J.S.; Raes, J. Duplication and divergence: The evolution of new genes and old ideas. *Annu. Rev. Genet.* **2004**, *38*, 615–643, doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.092831.
 132. Van De Peer, Y.; Maere, S.; Meyer, A. The evolutionary significance of ancient genome duplications. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 725–732, doi:10.1038/nrg2600.
 133. Jaillon, O.; Aury, J.-M.; Noel, B.; Policriti, A.; Clepet, C.; Casagrande, A.; Choisne, N.; Aubourg, S.; Vitulo, N.; Jubin, C.; et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **2007**, *449*, 463–7, doi:10.1038/nature06148.
 134. Velasco, R.; Zharkikh, A.; Troggio, M.; Cartwright, D.A.; Cestaro, A.; Pruss, D.; Pindo, M.; FitzGerald, L.M.; Vezzulli, S.; Reid, J.; et al. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* **2007**, *2*, doi:10.1371/journal.pone.0001326.
 135. Giannuzzi, G.; D'Addabbo, P.; Gasparro, M.; Martinelli, M.; Carelli, F.N.; Antonacci, D.; Ventura, M. Analysis of high-identity segmental duplications in the grapevine genome. *BMC Genomics* **2011**, *12*, doi:10.1186/1471-2164-12-436.
 136. Ziolkowski, P.A.; Blanc, G.; Sadowski, J. Structural divergence of chromosomal segments that arose from successive duplication events in the Arabidopsis genome. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1339–1350, doi:10.1093/nar/gkg201.
 137. Wang, N.; Xiang, Y.; Fang, L.; Wang, Y.; Xin, H.; Li, S. Patterns of Gene Duplication and Their Contribution to Expansion of Gene Families in Grapevine. *Plant Mol. Biol. Report.* **2013**, *31*, 852–861, doi:10.1007/s11105-013-0556-5.
 138. Lex E.Flagel; Jonathan, F.W. Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytol.* **2009**, *183*, 557–564.
 139. Xu, G.; Guo, C.; Shan, H.; Kong, H. Divergence of duplicate genes in exon – intron structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 1187–1192, doi:10.1073/pnas.1109047109.
 140. Li, Y.; Chu, Z.; Luo, J.; Zhou, Y.; Cai, Y.; Lu, Y.; Xia, J.; Kuang, H.; Ye, Z.; Ouyang, B. The C2H2 zinc finger-protein SIZF3 regulates AsA synthesis and salt tolerance by interacting with CSN5B. *Plant Biotechnol. J.* **2018**, *16*, 1201–1213, doi:doi.org/10.1111/pbi.12863.
 141. Wang, K.; Ding, Y.; Cai, C.; Chen, Z.; Zhu, C. The role of C2H2 zinc finger proteins in plant responses to abiotic

- stresses. *Physiol. Plant.* **2019**, *165*, 690–700, doi:10.1111/ppl.12728.
142. Noyce, P.W.; Harper, J.D.I.; Steel, C.C.; Wood, R.M. A New Description and the Rate of Development of Inflorescence Primordia over a Full Season in *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay. *Am. J. Enol. Vitic.* **2016**, *1*, 86–93, doi:10.5344/ajev.2015.14050.
 143. Evans, L.T. Flower Induction and the Florigen Concept. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1971**, *22*, 365–394, doi:10.1146/annurev.pp.22.060171.002053.
 144. Corbesier, L.; Vincent, C.; Jang, S.; Fornara, F.; Fan, Q.; Searle, I.; Giakountis, A.; Farrona, S.; Gissot, L.; Turnbull, C.; et al. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science (80-.)*. **2007**, *316*, 1030–1033, doi:10.1126/science.1141752.
 145. Andrés, F.; Coupland, G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 627–639, doi:10.1038/nrg3291.
 146. Matsoukas, I.G.; Massiah, A.J.; Thomas, B. Florigenic and antiflorigenic signaling in plants. *Plant Cell Physiol.* **2012**, *53*, 1827–1842, doi:10.1093/pcp/pcs130.
 147. Noyce, P.W. Finally, proof that leaf floral induction with photoperiodic dependent flowering does not occur in the grapevine plant (*Vitis vinifera* L. 'Chardonnay'). *Vitis - J. Grapevine Res.* **2017**, *56*, 119–126, doi:10.5073/vitis.2017.56.119-126.
 148. Posluszny, U.; Gerrath, J.M. The vegetative and floral development of the hybrid grape cultivar 'Ventura.' *Can. J. Bot.* **1986**, *64*, 1620–1631, doi:10.1139/b86-218.
 149. Srinivasan, C.; Mullins, M.G. Physiology of Flowering in the Grapevine — a Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **1981**, *32*, 47–63.
 150. Sanders, P.M.; Bui, A.Q.; Weterings, K.; McIntire, K.N.; Hsu, Y.C.; Lee, P.Y.; Truong, M.T.; Beals, T.P.; Goldberg, R.B. Anther developmental defects in Arabidopsis thaliana male-sterile mutants. *Sex. Plant Reprod.* **1999**, *11*, 297–322, doi:10.1007/s004970050158.
 151. Santiago, J.P.; Sharkey, T.D. Pollen development at high temperature and role of carbon and nitrogen metabolites. *Plant Cell Environ.* **2019**, *42*, 2759–2775, doi:10.1111/pce.13576.
 152. Carrizo García, C.; Nepi, M.; Pacini, E. It is a matter of timing: asynchrony during pollen development and its consequences on pollen performance in angiosperms—a review. *Protoplasma* **2017**, *254*, 57–73, doi:10.1007/s00709-016-0950-6.
 153. Fadón, E.; Herrero, M.; Rodrigo, J. Anther and pollen development in sweet cherry (*Prunus avium* L.) in relation to winter dormancy. *Protoplasma* **2019**, *256*, 733–744, doi:10.1007/s00709-018-01332-4.
 154. Goldberg, R.B.; Beals, T.P.; Sanders, S.M. Anther development: Basic principles and practical applications. *Plant Cell* **1993**, *5*, 1217–1229, doi:10.1105/tpc.5.10.1217.
 155. Borg, M.; Twell, D. Pollen: Structure and Development. *eLS* **2011**, 1–11, doi:10.1002/9780470015902.a0002039.pub2.
 156. Iwakawa, H.; Shinmyo, A.; Sekine, M. Arabidopsis CDKA1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. *plant J.* **2006**, *45*, 819–831, doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02643.x.
 157. Scott, R.J.; Spielman, M.; Dickinson, H.G. Stamen Structure and Function. *Plant Cell* **2004**, *16*, 46–61, doi:10.1105/tpc.017012.sequentially.
 158. Tsou, C.H.; Cheng, P.C.; Tseng, C.M.; Yen, H.J.; Fu, Y.L.; You, T.R.; Walden, D.B. Anther development of maize (*Zea mays*) and longstamen rice (*Oryza longistaminata*) revealed by cryo-SEM, with foci on locular dehydration and pollen arrangement. *Plant Reprod.* **2015**, *28*, 47–60, doi:10.1007/s00497-015-0257-3.
 159. Rutley, N.; Twell, D. A decade of pollen transcriptomics. *Plant Reprod.* **2015**, *28*, 73–89, doi:10.1007/s00497-015-0261-7.
 160. Lora, J.; Herrero, M.; Hormaza, J.I. The coexistence of bicellular and tricellular pollen in *Annona cherimola* (Annonaceae): Implications for pollen evolution. *Am. J. Bot.* **2009**, *96*, 802–808, doi:10.3732/ajb.0800167.
 161. Guarnieri, M.; Speranza, A.; Nepi, M.; Artese, D.; Pacini, E. Ripe pollen carbohydrate changes in *Trachycarpus fortunei*: The effect of relative humidity. *Sex. Plant Reprod.* **2006**, *19*, 117–124, doi:10.1007/s00497-006-0027-3.
 162. Honys, D.; Twell, D. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis. *Genome Biol.* **2004**, *5*, doi:10.1186/gb-2004-5-11-r85.

163. Ma, H. Molecular Genetic Analyses of Microsporogenesis and Microgametogenesis in Flowering Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2005**, *56*, 393–434, doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141717.
164. Ma, H. Molecular Genetic Analyses of Microsporogenesis and Microgametogenesis in Flowering Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2005**, *56*, 393–434, doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141717.
165. Coen, E.S.; Meyerowitz, E.M. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature* **1991**.
166. Bowman, J.L.; Smyth, D.R.; Meyerowitz, E.M. Genes directing flower development in arabidopsis. *Plant Cell* **1989**, *1*, 37–52, doi:10.1105/tpc.19.00276.
167. Goto, K.; Meyerowitz, E.M. Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA. *Genes Dev.* **1994**, *8*, 1548–1560, doi:10.1101/gad.8.13.1548.
168. Yanofsky, M.F.; Ma, H.; Bowman, J.L.; Drews, G.N.; Feldmann, K.A.; Meyerowitz, E.M. The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* **1990**, *346*, 35–39, doi:10.1038/346035a0.
169. Irish, V.F. Petal and stamen development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **1998**, *41*, 133–161, doi:10.1016/s0070-2153(08)60272-0.
170. Mizukami, Y.; Ma, H. Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* in transgenic Arabidopsis plants alters floral organ identity. *Cell* **1992**, *71*, 119–131, doi:10.1016/0092-8674(92)90271-D.
171. Huala, E.; Sussex, I.M. *LEAFY* interacts with floral homeotic genes to regulate arabidopsis floral development. *Plant Cell* **1992**, *4*, 901–913, doi:10.2307/3869458.
172. Shannon, S.; Meeks-Wagner, D.R. Genetic interactions that regulate inflorescence development in arabidopsis. *Plant Cell* **1993**, *5*, 639–655, doi:10.2307/3869807.
173. Yang, W.; Ye, D.; Xu, J.; Sundaresan, V. The *SPOROCTELESS* gene of Arabidopsis is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2108–2117.
174. Schiefthaler, U.; Balasubramanian, S.; Sieber, P.; Chevalier, D.; Wisman, E.; Schneitz, K. Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 11664–11669, doi:10.1073/pnas.96.20.11664.
175. Liu, X.; Huang, J.; Parameswaran, S.; Ito, T.; Seubert, B.; Auer, M.; Rymaszewski, A.; Jia, G.; Owen, H.A.; Zhao, D. The *SPOROCTELESS/NOZZLE* gene is involved in controlling stamen identity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2009**, *151*, 1401–1411, doi:10.1104/pp.109.145896.
176. Canales, C.; Bhatt, A.M.; Scott, R.; Dickinson, H. *EXS*, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1718–1727, doi:10.1016/S0960-9822(02)01151-X.
177. Zhao, D.-Z.; Wang, G.-F.; Speal, B.; Ma, H. The *EXCESS MICROSPOROCTES1* that controls somatic and reproductive repeat receptor protein kinase gene encodes a putative leucine-rich cell fates in the Arabidopsis anther. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2021–2031, doi:10.1101/gad.997902.pollen.
178. Yang, S.; Xie, L.; Mao, H.; Puah, C.S.; Yang, W.; Jiang, L.; Sundaresan, V.; Ye, D. *TAPETUM DETERMINANT1* Is Required for Cell Specialization in the Arabidopsis Anther The Plant Cell. *Plant Cell* **2003**, *15*, 2792–2804, doi:10.1105/tpc.016618.0ur.
179. Gómez, J.F.; Talle, B.; Wilson, Z.A. Anther and pollen development: A conserved developmental pathway. *J. Integr. Plant Biol.* **2015**, *57*, 876–891, doi:10.1111/jipb.12425.
180. Hord, C.L.H.; Chen, C.; Deyoung, B.J.; Clark, S.E.; Ma, H. The *BAM1/BAM2* Receptor-like kinases are important regulators of Arabidopsis early anther development. *Plant Cell* **2006**, *18*, 1667–1680, doi:10.1105/tpc.105.036871.2.
181. Albrecht, C.; Russinova, E.; Hecht, V.; Baaijens, E.; Vries, S. De The Arabidopsis thaliana *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1* and *2* Control Male Sporogenesis. **2005**, *17*, 3337–3349, doi:10.1105/tpc.105.036814.as.
182. Colcombet, J.; Boisson-Dernier, A.; Ros-Palau, R.; Vera, C.E.; Schroeder, J.I. Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1* and *2* are essential for tapetum development and microspore maturation. *Plant Cell* **2005**, *17*, 3350–3361, doi:10.1105/tpc.105.036731.1.
183. Zhang, W.; Sun, Y.; Timofejeva, L.; Chen, C.; Grossniklaus, U.; Ma, H. Regulation of Arabidopsis tapetum development and function by *DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1)* encoding a putative bHLH transcription factor. *Development*

- 2006**, 133, 3085–3095, doi:10.1242/dev.02463.
184. Sorensen, A.M.; Kröber, S.; Unte, U.S.; Huijser, P.; Dekker, K.; Saedler, H. The Arabidopsis aborted microspores (ams) gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J.* **2003**, 33, 413–423, doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01644.x.
 185. Xu, J.; Ding, Z.; Vizcay-Barrena, G.; Shi, J.; Liang, W.; Yuan, Z.; Werck-Reichhart, D.; Schreiber, L.; Wilson, Z.A.; Zhang, D. ABORTED MICROSPORES acts as a master regulator of pollen wall formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **2014**, 26, 1544–1556, doi:10.1105/tpc.114.122986.
 186. Li, S.F.; Higginson, T.; Parish, R.W. A novel MYB-related gene from Arabidopsis thaliana expressed in developing anthers. *Plant Cell Physiol.* **1999**, 40, 343–347, doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029548.
 187. Higginson, T.; Li, S.F.; Parish, R.W. AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in Arabidopsis thaliana. *plant J.* **2003**, 35, 177–192, doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01791.x.
 188. Li, S.F.; lacuone, S.; Parish, R.W. Suppression and restoration of male fertility using a transcription factor. *Plant Biotechnol. J.* **2007**, 5, 297–312, doi:10.1111/j.1467-7652.2007.00242.x.
 189. Millar, A.A.; Gubler, F. The Arabidopsis GAMYB-like Genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. *Plant Cell* **2005**, 17, 705–721, doi:10.1105/tpc.104.027920.
 190. Tsuji, H.; Aya, K.; Ueguchi-Tanaka, M.; Shimada, Y.; Nakazono, M.; Watanabe, R.; Nishizawa, N.K.; Gomi, K.; Shimada, A.; Kitano, H.; et al. GAMYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. *Plant J.* **2006**, 47, 427–444, doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02795.x.
 191. Wilson, Z.A.; Morroll, S.M.; Dawson, J.; Swarup, R.; Tighe, P.J. 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.* **2001**, 28, 27–39.
 192. Yang, C.; Vizcay-barrena, G.; Conner, K.; Wilson, Z.A. MALE STERILITY1 Is Required for Tapetal Development and Pollen Wall Biosynthesis. *Plant Cell* **2007**, 19, 3530–3548, doi:10.1105/tpc.107.054981.
 193. Vizcay-Barrena, G.; Wilson, Z.A. Altered tapetal PCD and pollen wall development in the Arabidopsis ms1 mutant. *J. Exp. Bot.* **2006**, 57, 2709–2717, doi:10.1093/jxb/erl032.
 194. Nowack, M.K.; Grini, P.E.; Jakoby, M.J.; Lafos, M.; Koncz, C.; Schnittger, A. A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. *Nat. Genet.* **2006**, 38, 63–67, doi:10.1038/ng1694.
 195. Gusti, A.; Baumberger, N.; Nowack, M.; Pusch, S.; Eisler, H.; Veylder, L. De; Schnittger, A.; Genschik, P. The Arabidopsis thaliana F-Box Protein FBL17 is essential for progression through the second mitosis during Pollen Development. *PLoS One* **2009**, 4, doi:10.1371/journal.pone.0004780.
 196. von Besser, K.; Frank, A.C.; Johnson, M.A.; Preuss, D. Arabidopsis HAP2 (GCS1) is a sperm-specific gene required for pollen tube guidance and fertilization. *Development* **2006**, 133, 4761–4769, doi:10.1242/dev.02683.
 197. Mori, T.; Kuroiwa, H.; Higashiyama, T.; Kuroiwa, T. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nat. Cell Biol.* **2006**, 8, 64–71, doi:10.1038/ncb1345.
 198. Mori, T.; Igawa, T.; Tamiya, G.; Miyagishima, S.Y.; Berger, F. Gamete attachment requires GEX2 for successful fertilization in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **2014**, 24, 170–175, doi:10.1016/j.cub.2013.11.030.
 199. Baggiolini, M. Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Rev. Rommande d'Agriculture Vitic. d'Arboriculture* **1952**, 1, 4–6.
 200. Lorenz, D.H.; Eichorn, K.W.; Bleiholder, H.; Klose, R.; Meier, U.; Weber, E. Growth Stages of the Grapevine: Phenological growth stages of the grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*)—Codes and descriptions according to the extended BBCH scale. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1995**, 1, 100–103, doi:10.1111/j.1755-0238.1995.tb00085.x.
 201. Coombe, B.G. Growth Stages of the Grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1995**, 1, 104–110, doi:10.1111/j.1755-0238.1995.tb00086.x.
 202. Oh, S.A.; Park, K.S.; Twell, D.; Park, S.K. The SIDECAR POLLEN gene encodes a microspore-specific LOB/AS2 domain protein required for the correct timing and orientation of asymmetric cell division. *Plant J.* **2010**, 64, 839–850, doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04374.x.
 203. Park, S.K.; Howden, R.; Twell, D. The Arabidopsis thaliana gametophytic mutation gemini pollen 1 disrupts

- microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development* **1998**, *125*, 3789–3799.
204. Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402, doi:10.1093/nar/25.17.3389.
 205. Reid, K.E.; Olsson, N.; Schlosser, J.; Peng, F.; Lund, S.T. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* **2006**, *6*, 27, doi:10.1186/1471-2229-6-27.
 206. Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S.; Madden, T.L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **2012**, *13*, 134, doi:10.1186/1471-2105-13-134.
 207. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDCT Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408, doi:10.1006/meth.2001.1262.
 208. Berardini, T.Z.; Reiser, L.; Li, D.; Mezheritsky, Y.; Muller, R.; Strait, E.; Huala, E. The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *Genesis* **2015**, *53*, 474–485, doi:10.1002/dvg.22877.
 209. Grimplet, J.; Martínez-Zapater, J.M.; Carmona, M.J. Structural and functional annotation of the MADS-box transcription factor family in grapevine. *BMC Genomics* **2016**, *17*, doi:10.1186/s12864-016-2398-7.
 210. Palumbo, F.; Vannozzi, A.; Magon, G.; Lucchin, M.; Barcaccia, G. Genomics of flower identity in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1–15, doi:10.3389/fpls.2019.00316.
 211. Carmona, M.J.; Cubas, P.; Martínez-zapater, J.M. VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 68–77, doi:10.1104/pp.002428.et.
 212. Ferguson, A.C.; Pearce, S.; Band, L.R.; Yang, C.; Ferjentsikova, I.; King, J.; Yuan, Z.; Zhang, D.; Wilson, Z.A. Biphasic regulation of the transcription factor ABORTED MICROSPORES (AMS) is essential for tapetum and pollen development in Arabidopsis. *New Phytol.* **2016**, doi:10.1111/nph.14200.
 213. Phan, H.A.; Iacuone, S.; Li, S.F.; Parish, R.W. The MYB80 transcription factor is required for pollen development and the regulation of tapetal programmed cell death in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **2011**, *23*, 2209–2224, doi:10.1105/tpc.110.082651.
 214. Zheng, H.; Yu, X.; Yuan, Y.; Zhang, Y.; Zhang, Z.; Zhang, J.; Zhang, M.; Ji, C.; Liu, Q.; Tao, J. The VvMYB80 gene is abnormally expressed in *Vitis vinifera* L. cv. “Zhong Shan Hong” and its expression in tobacco driven by the 35s promoter causes male sterility. *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, 540–557, doi:10.1093/pcp/pcw011.
 215. Lebon, G.; Wojnarowicz, G.; Holzapfel, B.; Fontaine, F.; Vaillant-Gaveau, N.; Clément, C. Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 2565–2578, doi:10.1093/jxb/ern135.
 216. Gerrath, J.M.; Posluszny, U. Morphological and anatomical development in the Vitaceae. II. Floral development in *Vitis riparia*. *Can. J. Bot.* **1988**, *66*, 1334–1351.
 217. Lebon, G.; Duchêne, E.; Brun, O.; Magné, C.; Clément, C. Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sex. Plant Reprod.* **2004**, *17*, 71–79, doi:10.1007/s00497-004-0217-9.
 218. Fougère-Rifot, M.; Benharbit EL Alami, N.; Brun, O.; Bouard, J. Relations entre le développement défectueux des ovaires et l’involution des ovules chez *Vitis vinifera* L. var. Chardonnay. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* **1993**, *27*, 99–112, doi:10.20870/oeno-one.1993.27.2.1176.
 219. Lebon, G.; Duchêne, E.; Brun, O.; Clément, C. Phenology of flowering and starch accumulation in grape (*Vitis vinifera* L.) cuttings and vines. *Ann. Bot.* **2005**, *95*, 943–948, doi:10.1093/aob/mci108.
 220. Petrie, P.R.; Clingeleffer, P.R. Effects of temperature and light (before and after budburst) on inflorescence morphology and flower number of Chardonnay grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 59–65.
 221. Reis Pereira, M.; Ribeiro, H.; Abreu, I.; Eiras-Dias, J.; Mota, T.; Cunha, M. Predicting the flowering date of Portuguese grapevine varieties using temperature-based phenological models: A multi-site approach. *J. Agric. Sci.* **2018**, *156*, 865–876, doi:10.1017/S0021859618000850.

222. Verdugo-Vásquez, N.; Pañitru-De La Fuente, C.; Ortega-Farías, S. Model development to predict phenological scales of table grapes (cvs. thompson, crimson and superior seedless and red globe) using growing degree days. *Oeno One* **2017**, *51*, 277–288, doi:10.20870/oeno-one.2017.51.2.1833.
223. Williams, D.W.; Andris, H.L.; Beede, R.H.; Luvisi, D.A.; Norton, M.V.K.; Williams, L.E. Validation of a Model for the Growth and Development of the Thompson Seedless Grapevine. II. Phenology. *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, *36*, 283–289.
224. Cola, G.; Failla, O.; Maghradze, D.; Megrelidze, L.; Mariani, L. Grapevine phenology and climate change in Georgia. *Int. J. Biometeorol.* **2017**, *61*, 761–773, doi:10.1007/s00484-016-1241-9.
225. de Cortázar-Atauri, I.G.; Brisson, N.; Gaudillere, J.P. Performance of several models for predicting budburst date of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Int. J. Biometeorol.* **2009**, *53*, 317–326, doi:10.1007/s00484-009-0217-4.
226. Parker, A.K.; De Cortázar-Atauri, I.G.; Van Leeuwen, C.; Chuine, I. General phenological model to characterise the timing of flowering and veraison of *Vitis vinifera* L. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2011**, *17*, 206–216, doi:10.1111/j.1755-0238.2011.00140.x.
227. Fernández-González, M.; Rodríguez-Rajo, F.J.; Jato, V.; Escuredo, O.; Aira, M.J. Estimation of yield “Loureira” variety with an aerobiological and phenological model. *Grana* **2011**, *50*, 63–72, doi:10.1080/00173134.2011.561871.
228. Fernández-González, M.; Rodríguez-Rajo, F.J.; Escuredo, O.; Aira, M.J. Influence of thermal requirement in the aerobiological and phenological behavior of two grapevine varieties. *Aerobiologia (Bologna)*. **2013**, *29*, 523–535, doi:10.1007/s10453-013-9302-6.
229. Molitor, D.; Junk, J.; Evers, D.; Hoffmann, L.; Beyer, M. A high-resolution cumulative degree day-based model to simulate phenological development of grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2014**, *65*, 72–80, doi:10.5344/ajev.2013.13066.
230. Parenicová, L.; Folter, S. De; Kieffer, M.; Horner, D.S.; Favalli, C.; Busscher, J.; Cook, H.E.; Ingram, R.M.; Kater, M.M.; Davies, B.; et al. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **2003**, *15*, 1538–1551, doi:10.1105/tpc.011544.
231. Boss, P.K.; Sreekantan, L.; Thomas, M.R. A grapevine TFL1 homologue can delay flowering and alter floral development when overexpressed in heterologous species. *Funct. Plant Biol.* **2006**, *33*, 31–41.
232. Carmona, M.J.; Calonje, M.; Martínez-Zapater, J.M. The FT / TFL1 gene family in grapevine. *Plant Mol. Biol.* **2007**, *63*, 637–650, doi:10.1007/s11103-006-9113-z.
233. Calonje, M.; Cubas, P.; Martínez-Zapater, J.M.; Carmona, M.J. Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1491–1501, doi:10.1104/pp.104.040832.
234. Theißen, G. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2001**, *4*, 75–85, doi:10.1016/S1369-5266(00)00139-4.
235. Ferrándiz, C.; Gu, Q.; Martienssen, R.; Yanofsky, M.F. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **2000**, *127*, 725–734.
236. Sreekantan, L.; Torregrosa, L.; Fernandez, L.; Thomas, M.R. VvMADS9, a class B MADS-box gene involved in grapevine flowering, shows different expression patterns in mutants with abnormal petal and stamen structures. *Funct. Plant Biol.* **2006**, *33*, 877–886.
237. Huang, F.; Zhang, Y.; Hou, X. BcAP3, a MADS box gene, controls stamen development and male sterility in Pak-choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*). *Gene* **2020**, *747*, 144698, doi:10.1016/j.gene.2020.144698.
238. Coito, J.L.; Silva, H.; Ramos, M.J.N.; Montez, M.; Cunha, J.; Amâncio, S.; Costa, M.M.R.; Rocheta, M. *Vitis* flower sex specification acts downstream and independently of the ABCDE model genes. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1–20, doi:10.3389/fpls.2018.01029.
239. Schellenbaum, P.; Jacques, A.; Maillot, P.; Bertsch, C.; Mazet, F.; Farine, S.; Walter, B. Characterization of VvSERK1, VvSERK2, VvSERK3 and VvL1L genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep.* **2008**, *27*, 1799–1809, doi:10.1007/s00299-008-0588-8.
240. Vergara, R.; Noriega, X.; Aravena, K.; Prieto, H.; Pérez, F.J. ABA represses the expression of cell cycle genes and may modulate the development of endodormancy in grapevine buds. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 812, doi:10.3389/fpls.2017.00812.
241. Simpson, G.G.; Dean, C. Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time? *Science (80-.)*. **2002**, *296*, 285–289,

- doi:10.1126/stke.2002.149.tw334.
242. Verma, N. Transcriptional regulation of anther development in Arabidopsis. *Gene* **2019**, *689*, 202–209, doi:10.1016/j.gene.2018.12.022.
243. Takatsuji, H.; Mori, M.; Benfey, P.N.; Ren, L.; Chua, N.-H. Characterization of a zinc finger DNA-binding protein expressed specifically in Petunia petals and seedlings. *EMBO J.* **1992**, *11*, 241–249.
244. Hiratsu, K.; Ohta, M.; Matsui, K.; Å, M.O.-T. The SUPERMAN protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS Lett.* **2002**, *514*, 351–354.
245. Dathan, N.; Zaccaro, L.; Esposito, S.; Isernia, C.; Omichinski, J.G.; Riccio, A.; Pedone, C.; Blasio, B. Di; Fattorusso, R.; Pedone, P. V; et al. The Arabidopsis SUPERMAN protein is able to specifically bind DNA through its single Cys2-His2 zinc finger motif. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4945–4951.
246. Sakai, H.; Medrano, L.J.; Meyerowitz, E.M. Role of SUPERMAN in maintaining Arabidopsis floral whorl boundaries. *Nature* **1995**, *378*, 199–203.
247. Gaiser, J.C.; Robinson-beers, K.; Gasser, C.S. The Arabidopsis SUPERMAN Gene Mediates Asymmetric Growth of the Outer Integument of Ovules. *Plant Cell* **1995**, *7*, 333–345.
248. Breuil-Broyer, S.; Trehin, C.; Morel, P.; Boltz, V.; Sun, B.; Chambrier, P.; Ito, T.; Negrutiu, I. 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.* **2016**, *117*, 905–923, doi:10.1093/aob/mcw023.
249. Stilio, S. Di; Wu, H.; Cheung, A.Y. Arabidopsis and Tobacco SUPERMAN regulate hormone signalling and mediate cell proliferation and differentiation. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 949–961, doi:10.1093/jxb/erq325.
250. Xu, Y.; Prunet, N.; Gan, E.; Wang, Y.; Stewart, D.; Wellmer, F.; Huang, J.; Yamaguchi, N.; Tatsumi, Y.; Kojima, M.; et al. SUPERMAN regulates floral whorl boundaries through control of auxin biosynthesis. *EMBO J.* **2018**, *37*, e97499, doi:10.15252/embj.201797499.
251. Takeda, S.; Matsumoto, N.; Okada, K. RABBIT EARS, encoding a SUPERMAN-like zinc finger protein, regulates petal development in Arabidopsis thaliana. *Development* **2011**, *131*, 425–434, doi:10.1242/dev.00938.
252. Dinneny, J.R.; Yadegari, R.; Fischer, R.L.; Yanofsky, M.F.; Weigel, D. The role of JAGGED in shaping lateral organs. *Development* **2004**, *131*, 1101–1110, doi:10.1242/dev.00949.
253. Dinneny, J.R.; Weigel, D.; Development, M.F.Y.; Dinneny, J.R.; Weigel, D.; Yanofsky, M.F. NUBBIN and JAGGED define stamen and carpel shape in Arabidopsis. *Development* **2006**, *2285*, 1645–1655, doi:10.1242/dev.02416.
254. Lampugnani, E.R.; Kilinc, A.; Smyth, D.R. Auxin controls petal initiation in Arabidopsis. *Development* **2013**, *194*, 185–194, doi:10.1242/dev.084582.
255. Kapoor, S.; Kobayashi, A.; Takatsuji, H. Silencing of the tapetum-specific zinc finger gene TAZ1 causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in petunia. *Plant Cell* **2002**, *14*, 2353–2367, doi:10.1105/tpc.003061.
256. Lyu, T.; Hu, Z.; Liu, W.; Cao, J. Arabidopsis Cys2/His2 zinc-finger protein MAZ1 is essential for intine formation and exine pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *518*, 299–305, doi:10.1016/j.bbrc.2019.08.050.
257. Vincze, T.; Posfai, J.; Roberts, R.J. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3688–3691, doi:10.1093/nar/gkg526.
258. Lu, G.; Moriyama, E.N. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief. Bioinform.* **2004**, *5*, 378–388.
259. Clemente, T. Nicotiana (Nicotiana tabacum, Nicotiana glauca). In *Agrobacterium Protocols*; Wang, K., Ed.; Humana Press, 2006; Vol. 343, pp. 143–154.
260. Minio, A.; Massonnet, M.; Figueroa-Balderas, R.; Castro, A.; Cantu, D. Diploid genome assembly of the wine grape carménère. *G3 Genes, Genomes, Genet.* **2019**, *9*, 1331–1337, doi:10.1534/g3.119.400030.
261. Higo, K.; Ugawa, Y.; Iwamoto, M.; Korenaga, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 297–300, doi:10.1093/nar/27.1.297.
262. Lescot, M.; Déhais, P.; Thijs, G.; Marchal, K.; Moreau, Y.; Van De Peer, Y.; Rouzé, P.; Rombauts, S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 325–327, doi:10.1093/nar/30.1.325.

263. Rogers, H.J.; Bate, N.; Combe, J.; Sullivan, J.; Sweetman, J.; Swan, C.; Lonsdale, D.M.; Twell, D. Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10. *Plant Mol. Biol.* **2001**, *45*, 577–585, doi:10.1023/A:1010695226241.
264. Bate, N.; Twell, D. 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.* **1998**, *37*, 859–869.
265. Filichkin, S.A.; Leonard, J.M.; Monteros, A.; Liu, P.P.; Nonogaki, H. A novel endo- β -mannanase gene in tomato LeMAN5 is associated with anther and pollen development. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 1080–1087, doi:10.1104/pp.103.035998.
266. Hamilton, D.A.; Schwarz, Y.H.; Mascarenhas, J.P. A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. *Plant Mol. Biol.* **1998**, *38*, 663–669, doi:10.1023/A:1006083725102.
267. Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A.; Bevan, M.W. GUS fusions: B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **1987**, *6*, 3901–3907, doi:10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x.
268. Scott, M.P.; Farrell, P.H.O. SPATIAL PROGRAMMING OF GENE EXPRESSION IN EARLY DROSOPHILA EMBRYOGENESIS. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1986**, *2*, 49–80.
269. Clark, E.; Peel, A.D. Evidence for the temporal regulation of insect segmentation by a conserved sequence of transcription factors. *Development* **2018**, *145*, doi:10.1242/dev.155580.
270. Borg, M.; Brownfield, L.; Khatab, H.; Sidorova, A.; Lingaya, M.; Twell, D. The R2R3 MYB Transcription Factor DUO1 Activates a Male Germline-Specific Regulon Essential for Sperm Cell Differentiation in Arabidopsis. **2011**, *23*, 534–549, doi:10.1105/tpc.110.081059.
271. Russell, S.D.; Gou, X.; Wong, C.E.; Wang, X.; Yuan, T.; Wei, X.; Bhalla, P.L.; Singh, M.B. Genomic profiling of rice sperm cell transcripts reveals conserved and distinct elements in the flowering plant male germ lineage. *New Phytol.* **2012**, *195*, 560–573.
272. Higo, A.; Kawashima, T.; Borg, M.; Zhao, M.; López-vidriero, I.; Sakayama, H.; Montgomery, S.A.; Sekimoto, H.; Hackenberg, D.; Shimamura, M.; et al. Transcription factor DUO1 generated by neo-functionalization is associated with evolution of sperm differentiation in plants. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–13, doi:10.1038/s41467-018-07728-3.
273. Hollender, C.A.; Kang, C.; Darwish, O.; Geretz, A.; Matthews, B.F.; Slovin, J.; Alkharouf, N.; Liu, Z. Floral Transcriptomes in Woodland Strawberry Uncover Developing Receptacle and Anther. *Plant Physiol.* **2014**, *165*, 1062–1075, doi:10.1104/pp.114.237529.
274. Vondras, A.M.; Minio, A.; Blanco-ulate, B.; Figueroa-balderas, R.; Penn, M.A.; Zhou, Y.; Seymour, D.; Ye, Z.; Liang, D.; Espinoza, L.K.; et al. The genomic diversification of grapevine clones. *BMC Genomics* **2019**, *20*, 972.
275. Wang, X.; Tu, M.; Li, Z.; Wang, Y.; Wang, X. Current Progress and Future Prospects for the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) Genome Editing Technology in Fruit Tree Breeding. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **2018**, *37*, 233–258, doi:10.1080/07352689.2018.1517457.
276. Wang, Y.; Liu, X.; Ren, C.; Zhong, G.Y.; Yang, L.; Li, S.; Liang, Z. Identification of genomic sites for CRISPR/Cas9-based genome editing in the *Vitis vinifera* genome. *BMC Plant Biol.* **2016**, *16*, 3–9, doi:10.1186/s12870-016-0787-3.
277. Malnoy, M.; Viola, R.; Jung, M.H.; Koo, O.J.; Kim, S.; Kim, J.S.; Velasco, R.; Kanchiswamy, C.N. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1–9, doi:10.3389/fpls.2016.01904.
278. Ren, C.; Liu, X.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Duan, W.; Li, S.; Liang, Z. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–9, doi:10.1038/srep32289.
279. Nakajima, I.; Ban, Y.; Azuma, A.; Onoue, N.; Moriguchi, T.; Yamamoto, T.; Toki, S.; Endo, M. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–16, doi:10.1371/journal.pone.0177966.
280. Wang, X.; Tu, M.; Wang, D.; Liu, J.; Li, Y.; Li, Z.; Wang, Y.; Wang, X. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. *Plant Biotechnol. J.* **2018**, *16*, 844–855, doi:10.1111/pbi.12832.
281. Li, M.Y.; Jiao, Y.T.; Wang, Y.T.; Zhang, N.; Wang, B.B.; Liu, R.Q.; Yin, X.; Xu, Y.; Liu, G.T. CRISPR/Cas9-mediated VvPR4b editing decreases downy mildew resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Hortic. Res.* **2020**, *7*, doi:10.1038/s41438-020-00371-4.
282. Wan, D.Y.; Guo, Y.; Cheng, Y.; Hu, Y.; Xiao, S.; Wang, Y.; Wen, Y.Q. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of VvMLO3

- results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*). *Hortic. Res.* **2020**, *7*, doi:10.1038/s41438-020-0339-8.
283. Sunitha, S.; Rock, C.D. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of TAS4 and MYBA7 loci in grapevine rootstock 101-14. *Transgenic Res.* **2020**, *29*, 355–367, doi:10.1007/s11248-020-00196-w.
284. Petricka, J.J.; Clay, N.K.; Nelson, T.M. Vein patterning screens and the defectively organized tributaries mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2008**, *56*, 251–263, doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03595.x.