

INDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL	I
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE ANEXOS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
1 INTRODUCCION	1
1.1 Características del zinc como microelemento.	2
1.1.1 Propiedades bioquímicas del zinc.	2
1.1.2 Proteínas que interactúan con zinc.	3
1.1.3 Flujo de zinc en organismos vegetales.	5
1.2 Aspectos moleculares del transporte de zinc en plantas	7
1.2.1 Principales familias génicas involucradas en el transporte de zinc	7
1.2.1.1 Transportadores tipo ZIP	8
1.2.1.2 Transportadores tipo CDF	9
1.2.1.3 Transportadores tipo HMA	10
1.2.2 Regulación génica del transporte de zinc	12
1.2.2.1 Regulación transcripcional de la captación de zinc en levaduras	12
1.2.2.2 Regulación postraducciona de la captación de zinc en levaduras	13
1.2.2.3 Regulación génica de la homeostasis de zinc en plantas	14
1.3 El zinc como microelemento esencial en organismos vegetales.	15

1.4	Deficiencias de zinc en <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère y su impacto sobre el desarrollo reproductivo	16
1.4.1	El ciclo reproductivo de la vid	16
1.4.2	Alteraciones del proceso de desarrollo frutal en vides de la variedad Carménère	18
1.5	Hipótesis y objetivos.	22
2	MATERIALES Y METODOLOGIA.	24
2.1	Materiales:	25
2.1.1	Material vegetal.	25
2.1.2	Oligonucleótidos partidores utilizados en esta tesis.	25
2.1.3	Material biológico.	26
2.2	Métodos.	23
2.2.1	Identificación y aislamiento de genes para transportadores de zinc.	27
2.2.1.1	Purificación de ADN genómico de <i>V. vinifera</i> cv. Carménère.	27
2.2.1.2	Purificación de ARN y síntesis de ADNc	27
2.2.1.3	Aislamiento de genes mediante PCR “gen específico”.	27
2.2.1.4	Clonamiento y secuenciación de genes aislados.	28
2.2.2	Análisis de secuencias nucleotídicas	29
2.2.2.1	Determinación de estructura y organización genómica.	29
2.2.2.2	Análisis in silico de las regiones reguladoras en cis de los genes en estudio.	29
2.2.2.3	Análisis de secuencias aminoácidas deducidas, predicción de topología y localización subcelular.	29
2.2.2.4	Construcción de arboles filogenéticos.	30
2.2.3	Determinación de los perfiles de expresión de <i>VvZIP3</i> , <i>VvHMA5.4</i> y <i>VvMTP1</i> durante el desarrollo de <i>Vitis vinifera</i> Cv. Carménère mediante qRT-PCR.	30
2.2.4	Determinación de los patrones de acumulación de zinc durante el desarrollo reproductivo de <i>Vitis vinifera</i> Cv. Carménère.	31

2.2.5	Caracterización funcional de VvZIP3.	32
2.2.5.1	Complementación en levaduras.	32
2.2.5.2	Localización subcelular.	32
3	RESULTADOS.	34
3.1	Identificación y caracterización estructural de genes y proteínas involucradas en el transporte de zinc durante el desarrollo reproductivo de <i>Vitis vinifera</i> Cv. Carménère.	35
3.1.1	Aislamiento y secuenciación del gen <i>VvZIP3</i> .	35
3.1.2	<i>VvZIP3</i> conserva características propias de los transportadores de zinc pertenecientes a la familia ZIP.	36
3.1.3	La proteína de fusión <i>VvZIP3:mGFP5</i> es dirigida a la membrana plasmática en células epidermales de cebolla.	39
3.1.4	<i>VvZIP3</i> restaura el crecimiento limitado por zinc en la levadura doble mutante ZHY3.	40
3.1.5	Aislamiento y secuenciación del gen <i>VvMTP1</i> .	42
3.1.6	La proteína codificada por <i>VvMTP1</i> muestra una alta identidad con transportadores de zinc pertenecientes al grupo I de la superfamilia de proteínas CDF.	42
3.1.7	Aislamiento y secuenciación del gen <i>VvHMA5.4</i> .	46
3.1.8	La proteína codificada por <i>VvHMA5.4</i> presenta características estructurales propias de transportadores de la familia P1b-ATPasas.	46
3.1.9	Identificación del gen <i>VvZAP1</i> , secuencia similar a los genes homólogo a los genes <i>AtZAP1</i> y <i>ScZAP1p</i> que codifican para un factor de transcripción involucrado en la homeostasis de zinc.	50
3.2	Análisis del perfil transcripcional de los genes involucrados en transporte de micronutrientes <i>VvZIP3</i>, <i>VvHMA5.4</i> y <i>VvMTP1</i>, y del factor de transcripción <i>VvZAP1</i> durante el desarrollo reproductivo de <i>Vitis vinifera</i> Cv. Carménère.	51
3.2.1	<i>VvZIP3</i> se expresa principalmente durante el desarrollo reproductivo de <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère y se encuentra reprimido en bayas partenocárpicas.	51
3.2.2	<i>VvMTP1</i> es expresado diferencialmente al inicio de la maduración del fruto de <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère y su expresión se ve afectada en frutos partenocárpicos	54

3.2.3	<i>VvHMA5.4</i> es expresado diferencialmente durante el desarrollo reproductivo temprano de frutos normales y partenocárpico de <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère.	57
3.2.4	<i>VvZIP3</i> , <i>VvMTP1</i> , <i>VvHMA5.4</i> son expresados independientemente del factor de transcripción <i>VvZAP1</i> durante el desarrollo reproductivo de <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère.	59
3.3	Análisis del perfil de acumulación de zinc durante el desarrollo reproductivo de <i>Vitis vinifera</i> Cv. Carménère.	61
3.4	Análisis in silico de las regiones reguladoras de la expresión del gen <i>VvZIP3</i>	63
	DISCUSION	66
4.1	Transportadores de metales en <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère	67
4.1.1	La proteína <i>VvHMA5.4</i> participaría en la carga de micronutrientes durante el desarrollo temprano de la vid y su síntesis no se vería afectada por el evento partenocárpico en bayas.	67
4.1.2	<i>VvMTP1</i> , homólogo de <i>AtMTP1</i> es inducido al inicio de la maduración de las bayas de la vid y la proteína codificada se relaciona principalmente con el almacenamiento de zinc en la vacuola y	68
4.1.3	La proteína <i>VvZIP3</i> es un transportador de zinc perteneciente a la familia de transportadores ZIP y estaría asociado a la carga de zinc durante el desarrollo reproductivo normal del fruto de la vid.	70
4.1.4	Los genes <i>VvZIP3</i> , <i>VvMTP1</i> y <i>VvHMA5.4</i> actuarían espacial y temporalmente coordinados determinando la carga/descarga de metales durante el desarrollo reproductivo de <i>Vitis vinifera</i> cv. Carménère.	73
5	CONCLUSIONES.	77
6	BIBLIOGRAFIA.	79
7	ANEXOS	89
7.1	Anexo 1	90
7.2	Anexo 2	92

LISTA DE TABLAS

Tabla	Titulo	Página
1.1	Asignación de función molecular basada en ontología génica (GO:3674)	6

LISTA DE FIGURAS

Figura	Titulo	Página
Figura 1:	Estructura genómica de la secuencia denominada <i>VvZIP3</i> .	35
Figura 2:	Análisis de predicción de topología para <i>VvZIP3</i> .	37
Figura 3:	Comparación de la secuencia aminoacídica de <i>VvZIP3</i> con sus homólogos de otras especies vegetales.	37
Figura 4:	Relaciones filogenéticas entre <i>VvZIP3</i> y proteínas tipo ZIP desde <i>Vitis vinifera</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> .	38
Figura 5:	Localización celular de <i>VvZIP3:mGFP5</i> en planta.	39
Figura 6:	Complementación de la levadura mutante <i>ZHY3 (zrt1zrt2Δ)</i> con <i>VvZIP3</i> .	41
Figura 7:	Estructura genómica de secuencia denominada <i>VvMTP1</i> .	43
Figura 8:	Análisis de topología de <i>VvMTP1</i> .	43
Figura 9:	Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas relacionadas a <i>VvMTP1</i> .	44
Figura 10:	Relaciones filogenéticas entre <i>VvMTP1</i> y proteínas tipo CDF desde <i>Vitis vinifera</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> .	45
Figura 11:	Estructura genómica de secuencia denominada <i>VvHMA5.4</i> .	47
Figura 12:	Análisis de topología de <i>VvHMA1</i> .	47
Figura 13:	Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas relacionadas a <i>VvHMA5.4</i> .	48
		V

	Relaciones filogenéticas entre VvHMA5.4 y otras proteínas tipo HMA desde <i>Vitis vinifera</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> .	49
Figura 14:		
Figura 15:	Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas VvZAP1 y AtZAP1	50
Figura 16:	Perfil de expresión de VvZIP3 en varios órganos del cultivar carménère mediante q-PCR.	52
Figura 17:	Perfil de expresión de VvZIP3 en el estado de Pre-envero de bayas normales y partenocárpicas.	53
Figura 18:	Perfil de expresión de VvMTP1 en varios órganos del cultivar carménère mediante q-PCR.	55
Figura 19:	Perfil de expresión de VvMTP1 en el estado de Pre-envero de bayas normales y partenocárpicas.	56
Figura 20:	Perfil de expresión de VvHMA5.4 en varios órganos del cultivar carménère mediante q-PCR.	57
Figura 21:	Perfil de expresión de VvHMA5.4 en el estado de Pre-envero de bayas normales y partenocárpicas.	58
Figura 22:	Perfil de expresión de VvZAP1 en varios órganos del cultivar carménère mediante q-PCR.	60
Figura 23:	Patrón de acumulación de Zn ⁺² durante el desarrollo reproductivo de <i>Vitis vinifera</i> cv. <i>Carménère</i> .	62
Figura 24:	Patrón de acumulación de Zn ⁺² durante el desarrollo de bayas normales y partenocárpicas.	62
Figura 25:	Comparación de los elementos en cis identificados en VvZIP3 y AtZIP11.	64
Figura 26:	Abundancia de Transcritos para genes ZIP durante el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	65

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Titulo	Página
Anexo 1	Secuencias utilizadas para construir relaciones filogenéticas.	90
Anexo 2	Análisis in silico de zonas reguladoras (2000 bp) en transportadores ZIP de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Vitis vinifera</i> basados en JASPAR y ConSite.	92