

---

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN  
DEL TIPO C2H2-ZFP INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL POLEN DE  
VITIS VINIFERA**

**ÓSCAR ANDRÉS ARREY SALAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS  
(MENCIÓN EN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL)**

**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, *Arabidopsis*, 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 VviZFPs 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 VviZFPs in grapevine pollen development events.