



# Estudio de la ramificación en mutantes hormonales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

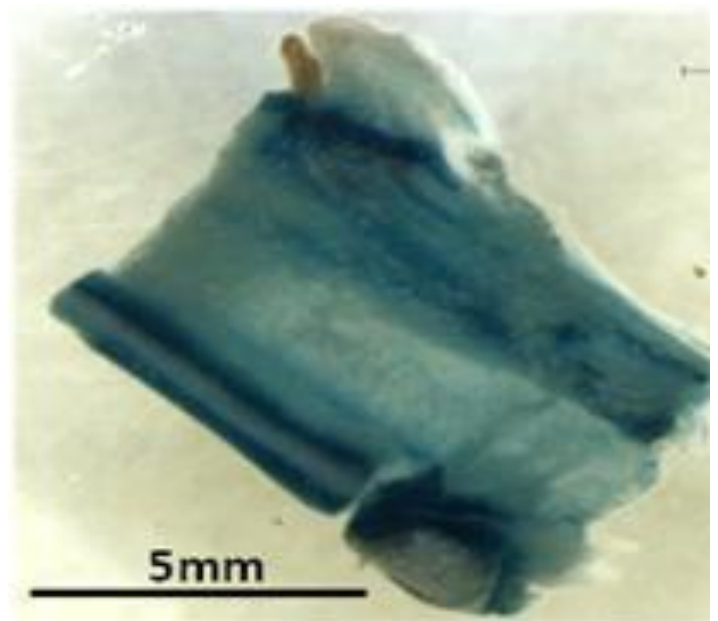
Trabajo Final de Máster presentado por  
Mónica Montoya Novillo

Directoras:

Dra. Esther Carrera Bergua

Dra. Isabel López Díaz

Tutor: Dr. José Miguel Mulet Salort



Valencia, 2015

### RESUMEN

Muchos son los factores que regulan la aparición de los brotes axilares en las plantas, las hormonas participan de forma decisiva en la ramificación lateral en plantas de tomate. Las hormonas vegetales auxinas (IAA) y estrigolactonas (SLs) participan en la formación de los brotes axilares en tomate según ha sido descrito. Las SLs constituyen el segundo mensajero inducido por IAA y responsables de la inhibición de la formación de los brotes axilares en tomate. Así pues en ausencia de IAA, los niveles de SLs se reducen, lo que permite la aparición de los brotes axilares.

Las giberelinas (GAs) son hormonas vegetales que controlan diversos procesos del desarrollo durante todo el ciclo de vida de las plantas, como el crecimiento de tallos, tiempo de floración y fructificación. Sin embargo no se ha demostrado su posible participación en la regulación de la formación de brotes axilares. Las giberelinas parecen tener un papel represor, tal como se observa en los mutantes de ramificación nula y en estudios realizados en el laboratorio, dónde se observa que el incremento de los niveles o la respuesta a GAs, en plantas de tomate, da lugar a fenotipos con menor ramificación. Las giberelinas, al igual que las SLs podrían actuar inhibiendo la aparición de los brotes axilares en tomate.

Con el objetivo de conocer el papel de las GAs en la formación de los brotes axilares de tomate se han realizado estudios de aparición y longitud de estos en cada una de las hojas de las diferentes líneas mutantes hormonales. Esto ha permitido medir y comparar los niveles hormonales, en los tejidos adyacentes al lugar de aparición de los brotes axilares, justo antes de que estos aparezcan. Los niveles hormonales han sido cuantificados por el sofisticado equipo Q-Exactive con Cromatografía Líquida de alta resolución y Espectrometría de Masas (UHPLC-MS). Además, se ha estudiado la localización o respuesta de las giberelinas y auxinas, en el lugar de aparición del brote axilar a lo largo del tallo, mediante tinción GUS en las líneas deladoras *MT-DR5-GUS* y *MT-20ox1-GUS*, para localizar auxinas y giberelinas respectivamente.

Los resultados obtenidos en esta línea de investigación son de gran interés agronómico. La obtención de variedades de tomate que no ramifiquen y que a su vez mantengan o incrementen el tamaño de sus frutos, son uno de los retos principales de nuestra comunidad científica y agrícola.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.	Proceso de ramificación lateral en plantas de tomate .....	1
1.1.1.	Hormonas vegetales: actividad, biosíntesis y su implicación en la ramificación lateral.....	1
1.2.	<i>Solanum lycopersicum</i> L.....	8
1.2.1.	Características generales.....	8
1.2.2.	Arquitectura y ramificación lateral de la planta de tomate .....	9
1.2.3.	El cultivar Micro-Tom .....	10
2	OBJETIVOS .....	11
3	MATERIAL Y MÉTODOS .....	12
3.1	Material vegetal .....	12
3.2	Soluciones y medios de cultivo .....	14
3.3	Condiciones de cultivo .....	14
3.3.1	Cultivo in vitro .....	14
3.3.2	Cultivo en invernadero.....	15
3.4	Tratamientos hormonales y requerimientos específicos de los cultivos.....	15
3.5	Control del patrón de ramificación .....	16
3.6	Evaluación de caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo en los mutantes hormonales .....	17
3.7	Cuantificación de los niveles hormonales.....	18
3.8	Tinción GUS y visualización en lupa .....	21
3.9	Obtención y rastreo de dobles mutantes ( <i>Screening</i> ) .....	22
3.10	Determinación de la expresión génica.....	24
3.10.1	Secuencias de los cebadores.....	24
3.10.2	Kits.....	25
3.10.3	Enzimas.....	25
3.10.4	Desarrollo experimental.....	25
3.11	Análisis Estadístico .....	28
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1	CAPÍTULO I. Caracterización fenotípica vegetativa y reproductiva .....	29
4.1.1	Caracterización Vegetativa.....	29
4.1.2	Caracterización Reproductiva .....	31
4.2	CAPÍTULO II. Estudio del fenotipo de ramificación lateral en líneas mutantes hormonales	33

4.2.1	Líneas mutantes hormonales .....	33
4.2.2	Fenotipo de ramificación en las líneas mutantes hormonales .....	33
4.2.3	Aparición de los brotes axilares .....	34
4.2.4	Longitud de los brotes axilares.....	36
4.3	CAPÍTULO III. Localización de auxinas y giberelinas en la planta .....	38
4.4	CAPÍTULO IV. Respuesta del mutante deficiente en estrigolactonas (MT-35S::asccD7) al tratamiento hormonal con giberelinas (GAs) .....	42
4.5	CAPÍTULO V. Cuantificación hormonal (qH).....	45
4.5.1	Cuantificación hormonal de plantas jóvenes (29 días) y adultas (45 días) de Micro-Tom.....	46
4.5.2	Cuantificación hormonal de mutantes con ramificación nula .....	47
4.5.3	Cuantificación hormonal de mutantes con ramificación adelantada a Micro-Tom.....	50
4.5.4	Cuantificación hormonal de mutantes con ramificación similar o ligeramente retrasada a Micro-Tom .....	52
4.6	CAPÍTULO VI. Rastreo y estudio del fenotipo de plantas doble mutante .....	53
4.6.1	Cruces entre mutantes hormonales con ausencia de ramificación (procera y MT-35S::20ox1_L19) y del mutante no hormonal (lateral suppressor) con mutantes que sí ramifican .....	54
4.6.2	Cruce entre el mutante con ramificación adelantada (MT-35S::asccD7) y el mutante entiere, sin diferencias en el tiempo de ramificación.....	60
4.6.3	Cruces de los mutantes con ramificación adelantada (MT-35S::asccD7 y MT-35S::CKX2) y las líneas deladoras GUS (20ox1::GUS y DR5::GUS) .....	62
4.7	CAPÍTULO VII. Análisis de expresión del gen BRANCHED (BRC) en yemas axilares .....	63
5	CONCLUSIÓN .....	65
6	BIBLIOGRAFÍA.....	67

ABREVIATURAS

<b>ABA</b> Ácido abscísico	<b>HT</b> Hoja terminal	<b>SA</b> Ácido salicílico
<b>ACN</b> Acetonitrilo	<b>IAA</b> Ácido 3-indol acético	<b>SAM</b> Meristemo apical
<b>BA</b> Brote axilar	<b>IR</b> Índice de refracción	<b>sit</b> Sittiens
<b>BR</b> Brasinosteroides	<b>KAO</b> Ent-kaurenoico oxidasa	<b>SLs</b> Estrigolactonas
<b>BRC1</b> Branched, factor transcripcional	<b>ls</b> Lateral suppressor	<b>SP</b> Gen self-pruning
<b>CKs</b> Citoquininas	<b>L19</b> línea transgénica sobre-expresora de GAs	<b>T.A</b> Temperatura ambiente
<b>CKX2</b> Gen de la enzima citoquinina oxidasa	<b>MI</b> Meristemo inflorescente	<b>UV</b> Luz ultravioleta
<b>dgt</b> Diageotrópica	<b>MS</b> Meristemo simpodial	<b>UHPLC-MS</b> Cromatografía líquida de alta resolución- Espectrometría de masas
<b>DR5::GUS</b> Línea delatora que responde a auxinas	<b>MT</b> Micro-Tom	<b>WT</b> Wild-type
<b>E</b> Entrenudo	<b>not</b> Nottabilis	<b>X-Glu</b> 5-bromo-4chloro-3-indolyl-β-D-glucoronide
<b>ent</b> Entire	<b>P</b> Pedúnculo	<b>13-HPOT</b> 13-linoléico hidroperóxido
<b>flc</b> Flacca	<b>PCB</b> Paclobutrazol	<b>20ox1::GUS</b> Línea delatora que responde a GAs
<b>GAs</b> Giberelinas	<b>pro</b> procera	
<b>GA2ox</b> Enzima GA 2-oxidasa	<b>pro-dgt</b> procera-diageotrópica	
<b>GA<sub>3</sub></b> Ácido giberélico	<b>RNA<sub>m</sub></b> RNA mensajero	
<b>GA20ox</b> Enzima GA 20-oxidasa	<b>RT-PCR</b> Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa	
<b>HS</b> Hoja Simpodial		

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Proceso de ramificación lateral en plantas de tomate

Uno de los objetivos principales en los cultivos de tomate es conseguir plantas que produzcan la mayor cantidad posible de frutos maduros de calidad. La ramificación lateral de estos cultivos es un factor negativo que afecta al rendimiento en la producción, ya que la planta centra su energía y dirige gran cantidad de nutrientes hacia la formación de los brotes laterales y no hacia la formación del fruto. Para evitarlo, los agricultores tienen que utilizar el método de poda manual para eliminar las ramas laterales, lo que conlleva un gasto económico añadido. Por ésta razón existen diferentes líneas de investigación interesadas en conocer como tiene lugar tanto la formación como desarrollo de las ramas laterales en tomate.

El patrón de ramificación lateral, componente principal en la arquitectura de la planta, deriva de una compleja regulación espacio-temporal en el crecimiento de la yema axilar. Numerosos factores endógenos tanto del desarrollo como ambientales están integrados a nivel de brote y también a nivel de planta, para determinar el número y posición de los nuevos brotes en crecimiento. Aunque el crecimiento del meristemo axilar puede darse en todas las hojas, la aparición depende de múltiples vías que convergen en integradores comunes que están muy probablemente implicados. Estas yemas pueden crecer inmediatamente y formar un brote lateral o bien permanecer en estado latente, llamado también de dormancia. La latencia de la yema puede ser temporal ya que en ciertas circunstancias, tales como el daño en la hoja donde se encuentra la yema axilar latente o por decapitación del meristemo apical, la latencia se rompe y se produce el desarrollo de dicha yema axilar.

##### *1.1.1 Hormonas vegetales. Actividad, biosíntesis y su implicación en la ramificación lateral.*

Durante décadas, los estudios de ramificación lateral han estado basados en experimentos de decapitación de las plantas, de este modo estimulaban el crecimiento de las yemas axilares. Consecuentemente se acuñó el término de dominancia apical al hecho por el cual el ápice de la planta ejerce un efecto inhibitorio de las yemas laterales.

### ➤ Auxinas

Las auxinas son hormonas vegetales que participan en el proceso de crecimiento mediante la elongación de las células vegetales. Además, también participan en procesos tales como la división celular del cambium, la diferenciación vascular, la formación de raíces y brotes laterales, la dominancia apical, así como en el desarrollo de frutos (Acosta-Echeverría, *et al.*, 2000). Las rutas comúnmente aceptadas de biosíntesis *in vivo* del IAA son triptófano – 3-indol acetamida y triptófano – 3-indol acetaldoxima (Hull *et al.*). Según Buchanan *et al* (2000) existiría una tercera ruta (Figura 1.1) donde el triptófano es convertido a triptamina y posteriormente en IAA.

Con respecto a la implicación de las auxinas en la ramificación lateral, diversos estudios han demostrado que las auxinas incrementan la formación de brotes laterales de manera indirecta, ya que no penetra en las yemas axilares (Leyser and Day, 2003). En el modelo clásico de dominancia apical, el IAA controla el movimiento desde la raíz hacia el ápice de una señal que entra en las yemas laterales y regula su crecimiento, por lo que la auxina estaría actuando a través de un segundo mensajero. Los candidatos propuestos como mensajeros secundarios de la auxina son hormonas tales como citoquininas (CKs), ácido abscísico (ABA) y SLs (Rameau, *et al.*, 2015).

### ➤ Estrigolactonas

Las estrigolactonas (SLs) son hormonas, recientemente reconocidas como tal, derivadas de los carotenoides. La función de las SLs es doble, por un lado intervienen en el control de la arquitectura de la planta mediante su implicación en la ramificación del tallo (Gómez-Roldán *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008) y por otro lado participan en el control de las relaciones de la planta con los organismos de su entorno (Paszkowski, 2006; Bouwmeester *et al.*, 2007). 5-didroxistrigol es la SL que presenta la estructura más sencilla y se la considera el precursor de todas las SLs por encontrarse ampliamente distribuida por toda la planta. Las SLs activas son sintetizadas a partir de  $\beta$ -caroteno por un conjunto de proteínas conservadas en plantas mono- y dicotiledóneas. El gen *DWARF27* (D27), primero caracterizado en arroz, codifica una isomerasa que actúa en los pasos iniciales de esta ruta mediante la transformación de *trans*- $\beta$ -caroteno a 9-*cis*- $\beta$ -caroteno. Posteriormente la dioxigenasa 7, de escisión de carotenoide (CCD7) y CCD8 producen carlactona, un posible compuesto intermedio en la ruta de biosíntesis (Chevalier, *et al.*, 2014).

Las SLs son una de las señales clave en la ramificación lateral (Rameau, 2015). Existen dos posibles hipótesis que implicaría a la hormona SL como mensajero secundario de la auxina. La primera propone que la auxina está regulando aguas arriba los genes

CCD7 y CCD8 que codifican dos carotenoide dioxigenasas, sin embargo resulta necesaria la cuantificación de los niveles de SL para confirmar esta regulación. La segunda hipótesis de canalización, explica la acción indirecta de la auxina en la inhibición de los brotes laterales sin entrar en la yema. Ésta se basa en que la exportación de la auxina en la yema por el tallo es necesaria para el crecimiento del brote. De acuerdo con esto, la activación de la yema puede también ser diana del flujo producido por la auxina en los brotes, en cuyo caso la dominancia apical competiría por el transporte de auxina. Dicha competición puede proporcionar una retroalimentación positiva entre el flujo y la polarización del transporte activo de la auxina (Rameau, *et al.*, 2015).

### ➤ Citoquininas

Las citoquininas (CKs) están implicadas en multitud de procesos tales como la división celular, proliferación de yemas axilares, neoformación de órganos *in vitro*, senescencia foliar, desarrollo de cloroplastos y floración (Segura, 2000).

Las CKs son derivados de la base púrica adenina (6-aminopurina). Todas ellas poseen un sustituyente, de naturaleza isoprenoide o aromática, en el nitrógeno amínico de la posición 5 del anillo de purina. Todas las citoquininas se generan a partir del DMAPP de la ruta del ácido mevalónico que se produce en los plastos (Figura 1.3). La *trans*-zeatina es la de mayor actividad. Ésta viene del AMP en el caso de las bacterias y del ADP y ATP en plantas. Durante la biosíntesis se obtiene un grupo isoprenoide hidroxilado (iPRTP) a partir del DMAPP, en presencia de IPT y ATP. El gen CYP735A se identificó como responsable de transformar el iPRTP en ZTP, al cual se le elimina la ribosa y se obtiene la *trans*-zetaina (Takei, *et al.*, 2004).

Experimentos de cuantificación de CKs realizados por Tankara, *et al* (2006) han demostrado que, tras la decapitación de la planta, su síntesis aumenta en los tejidos nodales pero no en las yemas axilares. Este incremento no se observa si se aplica auxina en la superficie decapitada de la planta. Por lo tanto, los autores hipotetizan que las CKs deberían ser transportadas desde los nudos a las yemas durmientes para inducir su crecimiento.

Concluyendo, las CKs actúan induciendo la ramificación lateral, ya que promueven la activación de la yema axilar directamente, pero su acción está condicionada por la hormona auxina que actuaría como represora de su síntesis.



➤ **Giberelinas**

Las giberelinas (GAs) están implicadas en diversos factores del crecimiento y desarrollo en la planta, actuando como reguladores endógenos del crecimiento y por lo tanto están implicadas en diversos procesos del desarrollo de las plantas como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas, la inducción de flores y el desarrollo de frutos (Hedden y Phillip, 2000; Thomas *et al.*, 2005; Hedden y Thomas, 2012).

Las giberelinas (GAs) son un grupo de compuestos orgánicos que pertenecen a la familia de diterpenos tetracíclicos ácidos (Talón, 2000; Thomas, *et al.*, 2005), sintetizados a partir de una ruta compleja que comprende 3 tipos de enzimas (ciclasas, monooxigenasas y dioxigenasas), y tiene lugar respectivamente en 3 compartimentos diferentes (plastidios, retículo endoplasmático y citosol). La ruta puede dividirse en 3 etapas (Yamaguchi, 2008): Síntesis de *ent*-kaureno a partir de GGDP, que tiene lugar en los plastidios mediante la acción de enzimas de tipo ciclasa. Posteriormente la conversión de *ent*-kaureno a GA<sub>12</sub> en la membrana del retículo endoplasmático y es catalizada por enzimas de tipo monooxigenasas dependientes de citocromo P450. Esta GA<sub>12</sub> es la primera de la ruta y precursora del resto de GAs en plantas superiores (Hedden y Thomas, 2012), y por último la síntesis de GAs de 19 y 20 carbonos en el citoplasma. La catalización es debida a dioxigenasas dependientes de 2-cetoglutarato y Fe<sup>2+</sup> (Yamaguchi y Kamiya, 2000). Según la especie esta última parte de la ruta puede seguir dos vías diferentes, la *ruta de hidroxilación temprana en el C-13*, ruta predominante en la mayoría de especies (siendo la GA<sub>1</sub>, la GA activa) y la *ruta de la no hidroxilación temprana en el C-1*, GA<sub>4</sub> como GA activa.

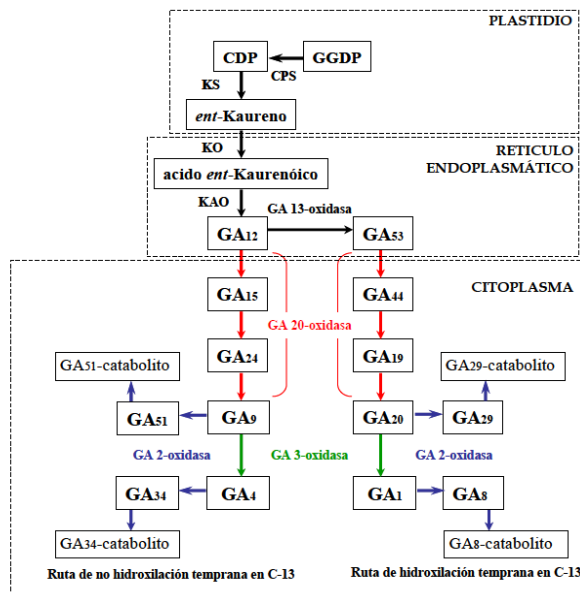


Figura 1.1. Esquema de la ruta del metabolismo de GAs (Martín, 2013).

La acción de las GAs es dependiente de la degradación de la proteína DELLA, factor de transcripción de la familia GRAS (Pysh, *et al.*, 1999). En el tomate sólo existe una proteína DELLA, a diferencia de *Arabidopsis thaliana* donde se conocen 5 (GAI, RGA, RGL1, RGL2 y RGL3). Las GAs se unen al receptor de las GAs, GID1 (Gibberellin Insensitive Dwarf-1) y posteriormente se forma un complejo compuesto por GAs-GID1 y las proteínas DELLA (Thomas, *et al.*, 2005; Ueguchi-Tanaka, *et al.*, 2005; Chebotar y Chebotar, 2011). Las proteínas DELLA actúan como reguladores negativos de la respuesta a GAs (Harberd, 2003). En el momento en que las GAs son percibidas por el receptor se induce la fosforilación de las proteínas DELLA y por tanto quedan predestinadas a la degradación por el proteosoma 26S (Hare, *et al.*, 2003). Después de la degradación de las proteínas DELLA se produce la activación de la transcripción de los genes de respuesta a GAs involucrados en multitud de procesos del desarrollo de las plantas.

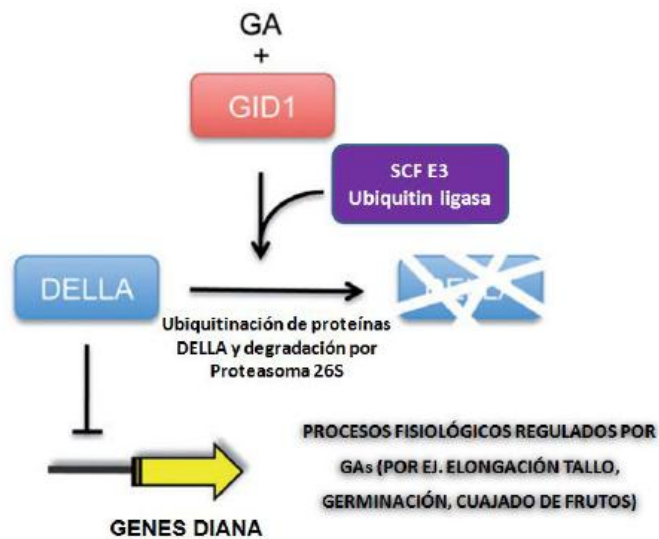


Figura 1.2. Modelo de percepción y señalización de GAs (Martínez, 2014).

El papel de las GAs en la ramificación lateral apenas ha sido caracterizado, aunque se ha observado que en especies como arroz, guisante y *Arabidopsis thaliana*, mutantes deficientes en GAs disponen de mayor ramificación lateral que el tipo silvestre. Del mismo modo, el enanismo está asociado con un incremento en la aparición de los brotes laterales (Murfet and Reid, 1993; Silverstone, *et al.*, 1997; Lo, *et al.*, 2008).

### ➤ Ácido salicílico

El ácido salicílico (SA) proporciona diversas funciones durante el desarrollo de la planta, tales como: inhibir la germinación y el crecimiento de las semillas, de la raíz y del coleoptilo, inducir la floración, provocar el cierre estomático y reducir la transpiración, mantener turgente los estomas, alterar la permeabilidad de los tilacoides y también, afectar a la fotosíntesis (Martín, 2013). Sin embargo, el papel más

importante que se ha descrito para la hormona SA en la planta es su implicación en la resistencia frente a diversos estreses. Los estreses son tanto de tipo abiótico (Drazic y Mihailovic, 2005) como biótico, ya que el SA activa la resistencia sistémica adquirida (SAR) en la planta y también media en las respuestas defensivas frente a patógenos (Chen *et al.*, 1993).

El SA es una hormona cuya estructura se caracteriza por la presencia de un anillo aromático. Es sintetizado a partir del compuesto final de la ruta del ácido shikímico, el corismato, a través de dos rutas diferentes: la ruta de la fenilalanina amino liasa (PAL) y la ruta del isocorismato (IC). En la ruta PAL el corismato pasa a ácido prefénico para ser transformado en fenilalanina y ésta en *trans*-cinámico, el cual puede seguir 4 vías distintas, dependiendo de la especie de planta, hasta llegar a formar SA. En la ruta de IC, desarrollada en los cloroplastos, se produce isocorismato a partir de corismato, y mediante la enzima isocorismato piruvato liasa (IPL) se transforma en SA y piruvato (Poveda, 2013).

No se ha descrito ningún papel del ácido salicílico en la ramificación lateral.

### ➤ **Ácido jasmónico**

Las funciones del ácido jasmónico (JA) en la planta son: regular el crecimiento, promover la senescencia y modular aspectos del desarrollo de la planta tales como la maduración del fruto, la viabilidad del polen o el crecimiento de la raíz (Zacarías y Lafuente, 2000). Además, tiene un papel clave en la regulación de la respuesta de la planta a estreses abióticos y bióticos, actuando como mediador de la resistencia sistémica inducida (ISR) (Rao y Davis, 2001; Ton, *et al.*, 2002).

El JA deriva del ácido linoleico (Vick y Zimmerman, 1983) y produce metiljasmonato (MeJA), compuesto fundamental en la señalización del JA, tras su metilación (Cheong y Choi, 2003). La ruta de biosíntesis del JA fue descrita por Vick y Zimmerman (1984) y se conoce con el nombre de ruta octodecanóica (Figura 1.5). Ellos demostraron que el JA era sintetizado a partir de la oxigenación del ácido linoléico, mediante una enzima lipoxigenasa (LOX), a ácido 13-linoléico hidroperóxido (13-HPOT). Este ácido graso hidroperóxido puede ser ciclado a ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) y posteriormente metabolizado a JA mediante una reducción y 3 ciclos de  $\beta$ -oxidación.

No se ha descrito ningún papel del ácido jasmónico en la ramificación lateral.

### ➤ **Ácido abscísico**

Las funciones del ácido abscísico (ABA) en el desarrollo de la planta son la embriogénesis, la maduración, la dormición de las semillas y control de las respuestas frente a estreses ambientales (McCarty, 1995; Zhang *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2007).

La biosíntesis de ABA, se produce mediante la síntesis de los epoxi-carotenoides, donde la zeaxantina se produce como isómero *trans* después de la ciclación e hidroxilación del *trans*-licopeno a través de  $\beta$ -caroteno. Los siguientes pasos consisten en la síntesis de isómeros *cis* de violaxantina y neoxantina que serán cortados para formar un precursor de quince átomos de carbono, la xantoxina. En el citosol, se produce la síntesis de ABA biológicamente activo a partir de la *cis*-xantoxina, en dos pasos enzimáticos pasando por el intermediario abscísico aldehído que es oxidado a ABA (Martín, 2013).

Los estudios realizados hasta el momento indican que las hormonas participan activamente en el proceso de ramificación lateral y que su acción puede ser positiva o negativa. Rameau, *et al.* (2015), han propuesto que no solo las hormonas clásicas (auxinas, SLs y CKs) están implicadas en la ramificación lateral, sino que otras señales tales como azúcares o giberelinas también pueden estar actuando en el proceso. Se ha propuesto un modelo (Figura 1.4) que representa la integración de todas las posibles rutas en el control del crecimiento axilar mediante el gen *BRC1*. Las proteínas DELLA podrían estar implicadas en la inhibición de los brotes axilares. Del mismo modo, existen experimentos en *Arabidopsis thaliana*, los cuales han mostrado que la señal de ABA es estimulada en la yema axilar mediante el gen *BRC1* (Gonzalez-Grandio, *et al.*, 2013). El déficit de las hormonas estrigolactonas y auxinas provocan el desarrollo de los brotes laterales mientras que el déficit en brasinosteroides produce la disminución de la ramificación lateral. No se conoce si el efecto represor de las GAs sobre la ramificación es dependiente de las SL, pero algunos análisis genéticos indican rutas independientes. Por ejemplo, el gen *LE* en guisante que controla la biosíntesis de GA y dobles mutantes de SL (*rmsl*) y GA (*le*), están más ramificados que *LE* en mutante simple lo que sugiere que las GAs están actuando de forma independiente a las SLs (de Saint Germain, *et al.*, 2013). Sin embargo, el enanismo no siempre está correlacionado con un incremento en la ramificación como se observa por ejemplo en mutantes de arroz y de guisante deficientes en brasinosteroides (*BR*), que muestran una reducción en la ramificación (Murfet and Reid, 1993; Tong, *et al.*, 2009).

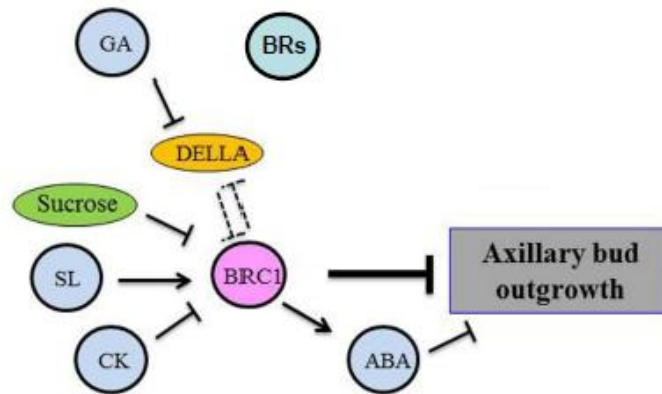


Figura 1.3. Posible participación de las giberelinas en el control del crecimiento de las yemas axilares mediante su acción sobre el gen *BRC1* (Rameau, *et al.*, 2015).

## 1.2 *Solanum lycopersicum* L.

### 1.2.1 Características generales

*Solanum lycopersicum* L. conocido vulgarmente como tomate, es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas. Las solanáceas son una familia de gran importancia económica entre las que se encuentran plantas de interés agrícola (patata, pimiento, berenjena o tabaco), plantas medicinales en las cuales se han caracterizados diferentes compuestos activos de interés farmacológico (atropina de la planta atropa; alcaloides de la planta hyoscyamus, o las propiedades sedantes de la planta whitania) y plantas ornamentales (petunia y de la familia nicotiana) (Bergounoux, 2013).

El tomate constituye una especie modelo por disponer de una serie de características de gran utilidad para la investigación, algunas de las cuales no se encuentran disponibles en otras especies modelo como *Arabidopsis thaliana* o arroz (*Oryza sativa* L.). Dichas características son el crecimiento simpodial, formación de hojas compuestas, frutos climatéricos carnosos tipo baya, ciclo de vida corto, insensibilidad a fotoperíodo, genoma relativamente pequeño (950 Mb) y facilidad para la transformación genética (Carvalho, *et al.*, 2011; Ranjan, *et al.*, 2012; Bergounoux, 2013). Además, existe un gran interés en el estudio de esta planta ya que su fruto dispone de un alto valor nutricional y es una de las hortalizas más consumidas a nivel mundial.

A parte de su importancia económica y nutricional, el tomate se ha convertido en planta modelo para el estudio de las bases genéticas, fisiológicas y moleculares, que controlan el desarrollo vegetal. Las razones son debidas a que existe:

- Gran información a nivel de los diferentes órganos de la planta (fisiológicos).
- Información de la estructura, función y comportamiento de los cromosomas (citogenético).
- Información de las funciones asociadas a los genes (genético).
- Mapas físicos.
- Secuenciación de uno de los genomas diploides más pequeños.
- Colecciones de mutantes naturales.

### 1.2.2 Arquitectura y ramificación lateral de la planta de tomate

La arquitectura de la planta de tomate presenta un patrón de crecimiento simpodial (Figura 1.11). A partir de la semilla empieza a emerger la raíz y el tallo, el meristemo apical de este último (SAM) comienza a producir nudos vegetativos u hojas (8 a 12 según la variedad) hasta que el SAM se transforma en meristemo inflorescente (MI) y produce una inflorescencia en forma de racimo. A este primer tramo de tallo se le denomina “segmento inicial” o tallo principal. Posteriormente, se activa el meristemo simpodial (MS) que es el meristemo situado en la axila de la última hoja (Hoja Terminal) antes de la inflorescencia terminal y el tallo continúa creciendo desplazando la inflorescencia terminal por debajo de la hoja terminal. A partir del MS aparecen tres nudos vegetativos y luego el MS se transforma en MI y sale otra inflorescencia. En este momento terminaría el patrón de crecimiento determinado mientras que en el caso del patrón de crecimiento indeterminado se activaría el siguiente MS y se volvería a repetir el proceso a lo largo del tallo a través de sucesivas unidades simpodiales formadas por tres hojas y una inflorescencia (Atherton y Harris, 1986; Schmitz y Theres, 1999).

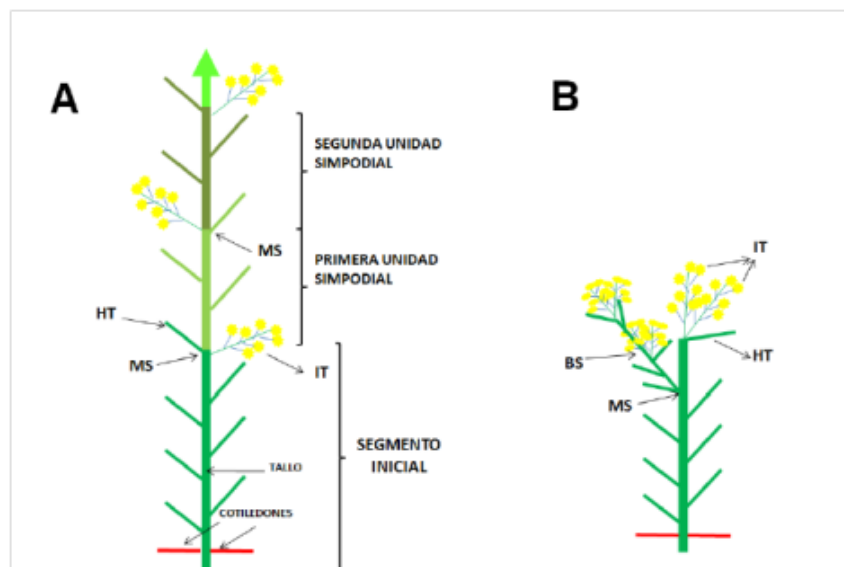


Figura 1.4. Representación esquemática de la arquitectura del tallo y patrón de crecimiento en tomate (Martínez, 2014). A: Patrón de crecimiento simpodial indeterminado; B: patrón de crecimiento determinado de mutantes *sp*. HT: Hoja Terminal, IT: Inflorescencia Terminal, MS: Meristemo Simpodial y BS: Brote Simpodial.

### 1.2.3 El cultivar *Micro-Tom*

El cultivar de tomate *Micro-Tom* (MT) presenta un fenotipo enano y fue obtenido como planta ornamental mediante el cruce entre los cultivares *Florida Basket* y *Ohio 4013-3* (Scott y Harbaugh, 1989). Las particularidades que lo caracterizan son: entrenudos cortos, frutos de pequeño tamaño (3-4g) y apariencia compacta. Este tipo de cultivar ha llegado a ser una planta modelo debido a que dispone de facilidad para la transformación genética, también tiene un ciclo de vida corto (60-90 días), comparado con cultivares no enanos, y además ocupa poco espacio, factor muy importante por la dificultad en la disponibilidad de espacio existente en los invernaderos (Carvalho, *et al.*, 2011).

El fenotipo enano de MT se debe a la existencia de varias mutaciones puntuales en los siguientes genes: *Dwarf*, gen que codifica una 6-deoxocatasterona deshidrogenasa de la ruta de biosíntesis de brasinosteroides, que conduce a un *missplicing*; *Self-pruning* (SP), gen que controla el fenotipo determinado/indeterminado; e *Internode Length Reduction* (Ilr), gen probablemente similar a *Miniature* (Mnt), el cual todavía no está caracterizado (Martí, *et al.*, 2006).

El patrón de crecimiento del cultivar MT es determinado debido a la mutación en el gen *SP* (Figura 1.11B). Generalmente, la planta se determina tras la aparición de 6-9 hojas y en la axila de la hoja terminal aparecen dos inflorescencias. Además, en la axila de la hoja anterior a la hoja terminal, llamada hoja simpodial, aparece un brote lateral que presenta el siguiente patrón de crecimiento: dos hojas – dos inflorescencias – dos hojas – dos inflorescencias (Carvalho, *et al.*, 2011). Posteriormente a la determinación y al desarrollo del brote simpodial, los meristemos de las axilas inferiores comienzan a desarrollar los brotes laterales con un patrón similar al brote simpodial. Al cabo de 70-80 días se han desarrollado todos los brotes en casi todas las axilas de la planta y esto proporciona a la planta ese aspecto arbustivo característico.

### 2. OBJETIVOS

Las giberelinas (GAs) son hormonas vegetales que controlan diversos procesos del desarrollo durante todo el ciclo de vida de las plantas, como el crecimiento de tallos, tiempo de floración y fructificación. Sin embargo no se ha estudiado su posible participación en la regulación de la formación de brotes axilares. Estudios realizados en el laboratorio han indicado que el incremento de los niveles o la respuesta a GAs, en plantas de tomate, da lugar a fenotipos con menor ramificación. Las GAs, al igual que las estrigolactonas (SLs), podrían actuar inhibiendo la aparición de los brotes axilares en tomate.

Con el objetivo de conocer el papel de las GAs en la formación de los brotes axilares de tomate, mediante técnicas de fisiología vegetal y biología molecular, la presente memoria pretende:

- 1) Estudiar el fenotipo de ramificación lateral en líneas mutantes hormonales de la variedad Micro-Tom de tomate.
- 2) Estudiar como las hormonas GAs y SLs influyen sobre la formación de los brotes axilares y si la interacción entre dichas hormonas se da a través de la regulación de su metabolismo. Para ello estudiaremos el fenotipo de plantas doble mutantes de tomate alteradas en la respuesta de GAs y bajos niveles de SLs (*MT-35S::asCCD7*).
- 3) Comparar los niveles de GAs, cuantificados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Espectrometría de Masas (UHPLC-MS), entre las plantas MT-WT (SL+) y *MT-35S::asCCD7* (SL-), para determinar en qué medida las SLs pueden influir en la regulación de las GAs.
- 4) a. Estudio del efecto de las GAs sobre la síntesis o la localización del IAA en los brotes axilares de las plantas mutantes para GAs (*procera* y *MT-35S::20ox1\_L19*), mediante la localización *in situ* del IAA por medio de tinciones GUS en líneas donde se ha introducido una construcción indicadora DR5::GUS que responde al IAA. *MT-DR5::GUS* vs *procera-DR5::GUS* y *L19-DR5::GUS*.  
  
b. Estudio de la síntesis o localización de GAs en los brotes axilares de las plantas WT, mediante la localización *in situ* de GAs por medio de tinciones GUS en líneas donde se ha introducido una construcción indicadora *20ox1::GUS* que responde a GAs (*MT-20ox1::GUS\_LA1*).



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Para la realización del presente trabajo se ha utilizado el cultivar de tomate Micro-Tom (MT), como planta control. Asimismo, se han usado líneas alteradas genéticamente en una de sus rutas hormonales, las cuales se muestran en la tabla 3.1. La mayoría de estas líneas mutantes se han obtenido de la colección de mutantes hormonales del laboratorio del Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, profesor de la Universidad de San Paolo de la Escuela Superior (ESALQ)-Brasil.

Además, se han usado las siguientes líneas deladoras: MT-DR5::GUS, *procera*-DR5::GUS, *L19*-DR5::GUS y *MT-20ox1::GUS\_LA1*.

Tabla 3.1. Líneas Mutantes Hormonales.

LÍNEAS MUTANTES	HORMONA IMPLICADA
<i>entire (ent)</i> , <i>diageotrópica (dgt)</i>	Auxina
<i>MT-35S::asccD7</i>	Estrigolactona
<i>MT-35S::CKX2</i>	Citoquininas
<i>MT-35S::20ox1_L19 (L19)</i> , <i>procera (pro)</i>	Giberelina
<i>MT-35S::nahG</i>	Ácido Salicílico
<i>MT-jai1-1</i>	Ácido Jasmónico
<i>sittiens (sit)</i> , <i>nottabilis (not)</i> , <i>flaca (flc)</i>	Ácido Abscísico
<i>lateral suppressor (ls)</i>	Ninguna (mutante no hormonal)

Mutantes relacionados con la hormona auxina, *diageotrópica (dgt)*, cuyo gen mutado codifica una ciclofilina. Las características fenotípicas de este mutante están relacionadas con una baja sensibilidad a auxinas, al presentar hojas hiponásticas, escasa ramificación y reducción en el tamaño del fruto (Ivanchenko, *et al.*, 2006; Oh, *et al.*, 2006). Mutante *entire (ent)* presenta una mutación puntual en la región codificante del gen represor *SIIAA9*. Este mutante presenta un incremento de la respuesta a ácido indol acético (IAA). Sus hojas son simples y sus frutos exhiben desarrollo partenocárpico (Zhang *et al.*, 2007).

Mutantes relacionados con la hormona estrigolactona, *MT-35S::asccD7*. Esta planta transgénica presenta un fenotipo de exceso de ramificación ya que dispone de una reducción en los niveles de estrigolactonas (SLs) (Vogel, *et al.*, 2010; Koltai, *et al.*, 2010).

Mutante hormonal de citoquininas (CKs), *MT-35S::CKX2*. Introgresión de la construcción del gen *CKX2*, citoquinina oxidasa, de *Arabidopsis*. Esta planta presenta bajos niveles endógenos de CKs, tiene un fenotipo con exceso de ramificación y de raíces. Además, sus hojas son de pequeño tamaño y parece que carecen de tricomas largos, los folíolos tienen un suave filo y las semillas necesitan más tiempo para germinar (Pino, *et al.*, 2010; Werner, *et al.*, 2003).

Mutantes hormonal de giberelinas (GAs), a) Línea mutante *CsGA-20ox1-L19*, es una línea transgénica sobre-expresora de giberelinas portadora de una construcción de sobre-expresión del gen *GA20ox1* de cítricos. Ésta línea transgénica presenta el fenotipo característico de exceso de giberelinas, caracterizado por tener mayor longitud de tallo y más delgado, hipocotilos y raíces más largas comparados con el control y algunas flores presentan exerción del estigma (García-Hurtado, *et al.*, 2012). Éste mutante presenta ausencia en la ramificación lateral (Carrera E, datos no publicados). B) Mutante *procera (pro)* presenta una mutación puntual en el dominio VHV(I/V)D de la proteína DELLA, la cual es represora de la acción de las giberelinas. *pro* presenta respuesta constitutiva a GAs a pesar de que sus niveles endógenos no son mayores. Sus características fenotípicas más destacables son presentar un tallo largo y delgado, exerción del estigma en todas las flores, gran porcentaje de frutos con aberraciones y partenocarpia de sus frutos al 100% (Carrera *et al.*, 2012). Éste mutante presenta un fenotipo sin ramificación lateral (Carrera E, datos no publicados).

Mutantes hormonal de ácido salicílico (SA). El mutante *MT-35S::nahG*, es portador de la construcción de sobre expresión del gen ácido salicílico hidrolasa, presentando niveles reducidos de SA. La disminución en los niveles de SA produce una necrosis espontánea en las hojas maduras. Además, estas plantas son susceptibles a la acción de muchos patógenos biotrópicos (Audenaert, *et al.*, 2002; Brading, *et al.*, 2000; Branch, *et al.*, 2004; Thara, *et al.*, 1999; Yan, *et al.*, 2002).

Mutantes hormonal de ácido jasmónico (JA), *MT-jai1-1*, tiene el alelo mutante *JAI*. Entre sus características fenotípicas destacar que hasta el momento de la floración no presenta ninguna diferencia con el cultivar MT. No obstante, tiene alta susceptibilidad al ataque por artrópodos y en el momento de la floración presenta pérdida de tricomas, senescencia de pétalos y esterilidad femenina, aunque los frutos maduros son normales (Li, *et al.*, 2004).

Mutantes hormonales de ácido abscísico (ABA), *sittiens (sit)*, *nottabilis (not)* y *flacca (flc)*. Se caracterizan por presentar un fenotipo con pequeñas hojas y síntomas de deshidratación.

Mutantes no hormonal, *lateral suppressor (ls)*, se caracteriza por su incapacidad en la formación de meristemas laterales y a su vez produce efectos pleiotrópicos en otros aspectos del desarrollo de la planta. La formación de meristemas axilares se bloquea durante la fase de crecimiento vegetativo y las flores no desarrollan pétalos y muestra reducida fertilidad femenina y masculina. El gen *ls* codifica a una proteína que es un posible factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas reguladoras GRAS (Lombardi-Crestana, *et al.*, 2012; Schumacher, *et al.*, 1999).

Líneas deladoras DR5::GUS y SIGA20ox1::GUS. *DR5::GUS* es portadora del gen reportero GUS tras el control del DR5, promotor inducible por auxinas el cual contiene el elemento AuxRE. Esta línea es indicadora de la sensibilidad y respuesta a auxinas. Del mismo modo se dispone de líneas doble mutantes, *pro-DR5::GUS* y *L19-DR5::GUS*, indicadoras del efecto de cada una de las mutaciones en la sensibilidad y/o respuesta a auxinas (Carrera E, datos no publicados). La línea deladora *SIGA20ox1::GUS* es portadora del gen reportero GUS tras el control del promotor del gen GA20ox1 de tomate, inducible por giberelinas. Ésta línea es indicadora de la sensibilidad y/o respuesta a giberelinas. (Carrera E, datos no publicados).

### 3.2 Soluciones y medios de cultivo

Para la preparación del medio de germinación de semillas se ha utilizado la solución mineral de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), suministrada comercialmente por Duchefa Biochimie B.V (Haarlem, Holanda). Las cantidades utilizadas para 1L de dicho medio fueron: 4,3g/L MS y 10g/L sacarosa. Ajuste del pH a 5,7 (ajustado con NaOH). Para medio sólido se añaden 8g/L fitoagar. Posteriormente, se esteriliza mediante autoclave por calor húmedo a 121°C durante 20 minutos.

Otro medio de germinación empleado ha sido la utilización de Agar industrial al 0,7%. Este medio se vierte directamente en las placas petri y no necesita esterilización.

### 3.3 Condiciones de cultivo

#### 3.3.1 Cultivo *in vitro*

En primer lugar, se realiza la esterilización de las semillas de tomate para descontaminarlas de bacterias y hongos. Se ponen las semillas necesarias en un recipiente y se añade lejía al 30% hasta que se cubran por completo y se dejan sumergidas durante 20 minutos a temperatura ambiente. En este tiempo de espera, la

cabina de flujo laminar es desinfectada con un papel mojado en etanol (70%) y después se deja bajo luz ultravioleta (UV) durante 10 minutos. Posteriormente, en cabina, se realiza el lavado que consiste en eliminar la lejía y añadir agua destilada estéril durante 5 minutos, este proceso será repetido 3 veces. Finalmente, el agua es eliminada y las semillas se traspasan a placas petri que contiene el medio de germinación dónde se pondrá la tapa y cerrará con cinta transpirable, se tatará con papel de aluminio y se dejará 2 días en oscuridad en cabina a 24°C para asegurar una germinación simultánea. Al tercer día se destapará la placa y se mantendrá en cabina a 24°C durante algunos días, hasta que se produzca la emergencia radicular y los hipocotilos tomen la coloración verde.

### 3.3.2 Cultivo en invernadero

Las plántulas se traspasan del medio de cultivo a tierra con el objetivo de obtener plantas adultas. En el proceso de aclimatación se usaron macetas de 12 cm de diámetro y como abono una mezcla de 2:1:1 de turba negra:perlita:vermiculita. Las macetas eran regadas 2 veces al día mediante goteo con la siguiente solución nutritiva:

$\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow 0,15$  (g/L),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \rightarrow 0,82$  (g/L),  $\text{KNO}_3 \rightarrow 0,2$  (g/L),  $\text{K}_2\text{SO}_4 \rightarrow 0,35$  (g/L),  
 $\text{MgSO}_4 \rightarrow 0,24$  (g/L) y BMX (Micronutrientes)  $\rightarrow 0,1$  (g/L)

Las condiciones de invernadero eran de día largo (16 h de luz y 8h de oscuridad). La luz procedía de lámparas de vapor de mercurio de 400 w. La temperatura se mantenía constante a 24°C  $\pm$  2°C durante el día y a 20°C  $\pm$  2°C durante la noche. La humedad relativa osciló entre 45-65% (diurna) y 75-90% (nocturna).

## 3.4 Tratamientos hormonales y requerimientos específicos de los cultivos

Algunas de las líneas utilizadas requieren de unos cuidados específicos para asegurar su ciclo vital.

- Cultivo en invernadero de los mutantes de tomate *sit*, *not* y *flc*: La escasa resistencia de estos mutantes al estrés hídrico, hace necesario ponerles una cubierta, para retener la humedad y pulverizar su parte aérea todos los días con agua, para prevenir la desecación.

Además, se han realizado tratamientos hormonales con giberelinas e inhibidores de giberelinas, de tipo paclobutrazol (PCB), en experimentos concretos, los

cuales han sido aplicados mediante pulverización (5 veces/semana) y riego (2 veces/semana).

- Tratamiento con ácido giberélico 3 (GA<sub>3</sub>): La solución de tratamiento se prepara a una concentración de 10<sup>-5</sup>M. Para 5L: 5ml de solución de stock 10<sup>-2</sup>M (173mg/50ml EtOH 100%), 5ml de stock de Tween 80 al 1% (10μl en 1ml de agua) y el resto agua (4980ml). Se disponían de 6 plantas problema y 6 plantas control y a cada una se le añadía 1/3 de un vaso de 225ml los lunes y miércoles y los viernes 3/4 partes del vaso. La pulverización diaria se realizaba hasta que las hojas estaban completamente mojadas.
- Tratamiento con PCB: Durante la realización de este tratamiento se tuvieron que tener una serie de precauciones ya que el PCB es tóxico y se acumula en la planta y en todas las superficies de plástico. Por ello, se utilizaron bandejas dedicadas exclusivamente a este fin y durante el tratamiento se tuvo la precaución de que no cayera solución con PCB por encima de las mesas del invernadero. La solución de tratamiento utilizada era 10<sup>-7</sup>M y para su preparación se añadió 50ml de solución de stock 10<sup>-2</sup>M (147mg/50ml EtOH 100%), 5ml de stock de Tween 80 al 1% (1μl en 1ml de agua) y el resto agua hasta los 5L. Se disponían de otras 6 plantas problema y 6 plantas control y a cada una se le hizo el tratamiento de forma similar al de GA<sub>3</sub>.
- Tratamiento con PCB+GA<sub>3</sub>: Se tomaron las mismas precauciones señaladas en el tratamiento con PCB. La solución de tratamiento estaba compuesta por 50ml de la solución stock PCB 10<sup>-2</sup>M, 5ml de la solución stock GA<sub>3</sub> 10<sup>-2</sup>M, 5ml de stock de Tween 80 al 1% (10μl en 1ml de agua) y el resto agua hasta los 5L. La aplicación se realizó del mismo modo que en los otros tratamiento a las 12 plantas.
- Tratamiento mock: Es el tratamiento control, en cual se le añaden los mismos componentes que en los otros casos y se sustituye a la GA<sub>3</sub> o al PCB por etanol. Por lo tanto, la solución de tratamiento estaba compuesta por 5ml de EtOH 100%, 5ml de stock de Tween 80 al 1% (10μl en 1ml de agua) y el resto agua (4990ml). Se realizó del mismo modo a 6 plantas control y 6 plantas problema.

### 3.5 Control del patrón de ramificación

La aparición de los brotes axilares en cada una de las hojas de los mutantes hormonales, hasta la hoja 6, se ha controlado a lo largo del tiempo. Las plantas se

cultivaron en condiciones de invernadero y una vez transcurridos 30 días se procedió a realizar la primera observación. Se consideró como ramificado aquellas axilas en las cuales aparecía un brote axilar  $\geq 0,5$  cm (Figura 3.1). Además, al finalizar el desarrollo reproductivo de la planta (3 meses) se realizó la medida de la longitud de cada uno de los brotes axilares que habían ramificado.

El parámetro utilizado, para comparar el momento de aparición de los brotes de cada línea con el control MT, ha sido el número de días que ha tardado en aparecer el brote en cada una de las 6 hojas. Este parámetro corresponde al fenotipo presentado por al menos el 67% de las plantas, es decir, a 4 de las 6 disponibles. También, se ha comparado mediante la longitud del brote axilar de cada una de las 6 hojas, el patrón de ramificación que sigue cada línea con respecto al control.

Las líneas empleadas fueron todas las nombradas en el apartado 3.1. Material Vegetal.



Figura 3.1. Axila que se considera ramificada. Tamaño brote axilar de 0,5 cm de longitud.

### 3.6 Evaluación de caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo en los mutantes hormonales

Para realizar la caracterización de las diversas líneas mutantes evaluamos una serie de caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas. Como control se utilizó la planta Micro-Tom.

- a. Desarrollo Vegetativo:
  - Altura total de la planta, medida hasta la axila de la hoja terminal (HT, hoja donde aparece la inflorescencia terminal).
  - Número de hojas hasta HT.
  - Longitud y anchura de la HT.

- Diámetro del tallo por debajo de la hoja simpodial (HS, hoja anterior a la HT), medido con pie de rey (Figura 2.2).
  - Número de folíolos, contados en la hoja correspondiente a la posición de dos hojas por debajo de la HT (HT- 2).
  - Aparición y longitud del brote axilar de HT-2.
- b. Desarrollo Reproductivo:
- Número de frutos por planta.
  - Peso de los frutos por planta.
  - Número de semillas por fruto.
  - Contenido en sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix) mediante refractometría, estimando el índice de refracción (IR) con un refractómetro de mano (ATAGO N-14) que compara la velocidad de la luz que pasa a través de un líquido, con la velocidad a la cual pasa a través de aire (Figura 3.2).

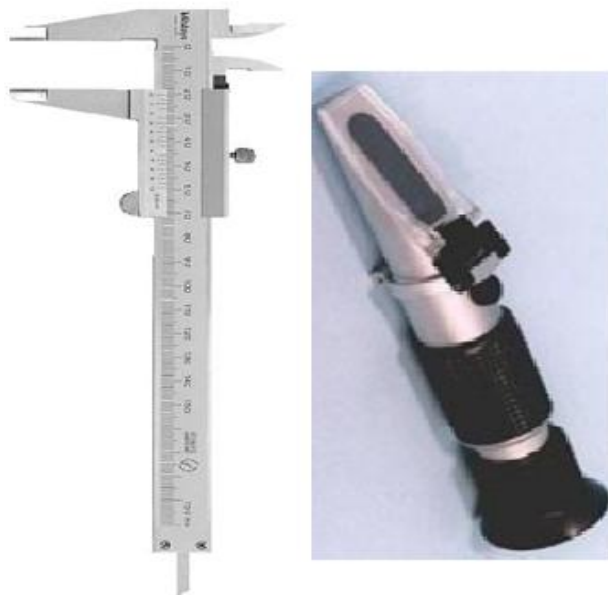


Figura 3.2. Pie de rey (izquierda) y refractómetro de mano (derecha).

### 3.7 Cuantificación de los niveles hormonales

Para tener conocimiento de las hormonas que se encuentran implicadas en la aparición de los brotes axilares se midieron los niveles de GAs, IAA, SA, JA y ABA en la planta mediante cuantificación tanto en los mutantes (*MT-35S::asccD7*, *MT-35S::CKX2*, *ls*, *sit*, *not* y *flc*) como en el silvestre (MT).

El tejido vegetativo utilizado en todos los casos fue recogido de 3 partes de la planta: peciolo, entrenudo y brote axilar latente (Figura 3.3). Cada muestra está formada por la mezcla de las partes correspondientes a las hojas 3 y 4. Se utilizaron 6

plantas de cada línea y del control MT cuyo estadio del desarrollo era anterior al día de aparición de la ramificación lateral. En la muestra de la yema axilar se intentó coger la menor cantidad de tejido del tallo o del peciolo, ya que esto produciría un error en la medida.

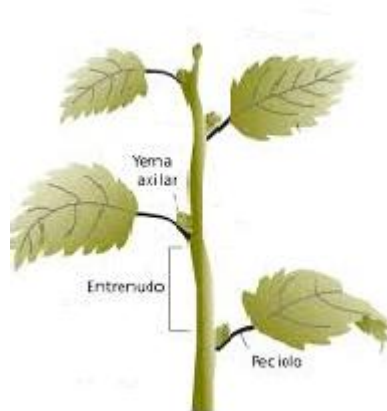


Figura 3.3. Partes de la planta utilizadas para la cuantificación hormonal.

El material vegetal se recolectó en condiciones de congelación con nitrógeno líquido y posteriormente fue triturado (máximo 200mg) con mortero en las mismas condiciones, para proceder a la extracción y purificación de las hormonas. El procedimiento se compone de los siguientes pasos (Figura 3.4) (M Seo, *et al.*, 2011):

### ➤ Extracción:

- En tubo Ependorf de 2ml, añadir a la muestra finamente triturada 10V de metanol (MeOH) 80% -1% ácido acético.
- Añadir los estándares internos.
- Extraer durante 1h en agitación sin temperatura y re-extraer con el mismo volumen de disolvente fresco durante 30 minutos. Centrifugar cada vez a 14000xg durante 10 min y agrupar los sobrenadantes en tubo de vidrio.
- Dejar *overnight* a -20°C para que se produzca la precipitación de las proteínas.
- Centrifugar 4 min a 4°C y pasar a tubo de vidrio para llevar a Rotovapor durante 2h y media sin temperatura, para eliminar el MeOH y obtener un extracto acuoso (0,4 ml aproximadamente si se extrajo con 2x1 ml) con trazas de ácido acético. Diluir hasta 1ml con 1% ácido acético en agua antes de purificar en columna Oasis HLB. Detalles de la columna: Absorbente polimérico de fase reversa para la extracción de amplio rango de compuestos ácidos, básicos y neutros (Waters, 30mg, 1ml, 30µm, de tamaño particular, Ref 186003908).

### ➤ Purificación:

- Equilibrar columnas HLB lavándolas con 1V de acetonitrilo (ACN), 1V de MeOH y 1V de disolvente inicial (H<sub>2</sub>O-1% Ácido acético).
- Aplicar el extracto acuoso a una columna Oasis HLB equilibrada.



- Lavar con 1ml de H<sub>2</sub>O-1% ácido acético para eliminar sales y compuestos muy polares.
- Eluir con 1ml de MeOH 95% - 1% ácido acético-H<sub>2</sub>O.
- Eliminar el eluido en Rotovapor sin temperatura hasta que esté completamente seco. Tiempo aproximado 3 horas.
- En este residuo seco se pueden cuantificar todas las GAs, ABA, IAA, JA y SA una vez las hallamos disuelto en 5% ACN-1% ácido acético-H<sub>2</sub>O.

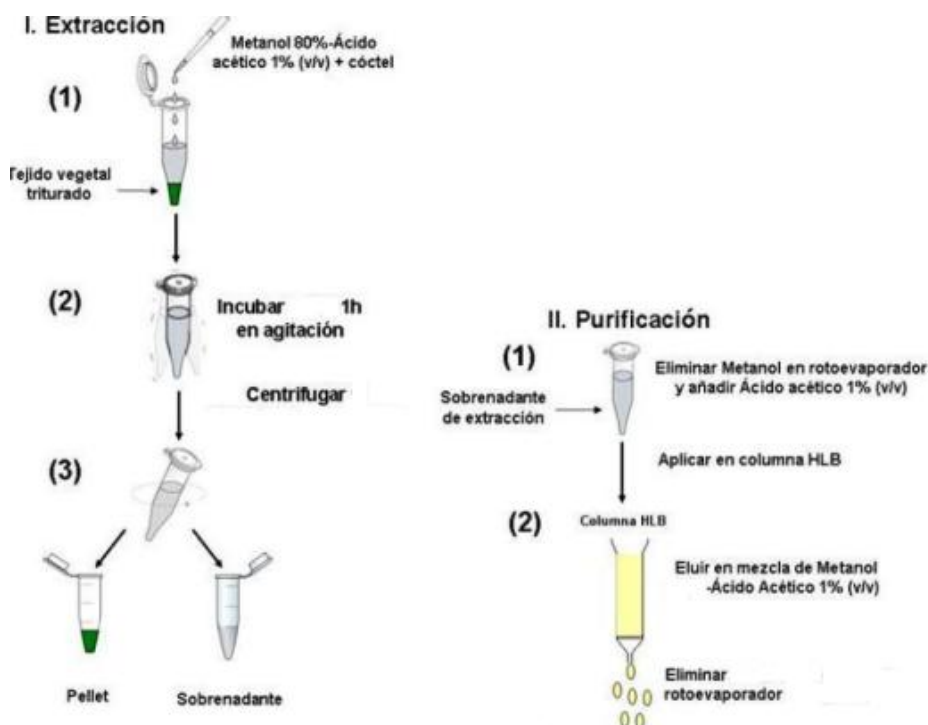


Figura 3.4. Esquema resumen del proceso de extracción y purificación de hormonas a partir de muestras de entrenudo, peciolo y yemas laterales de los mutantes hormonales y el control Micro-Tom. Adaptado de Martínez, 2014.

Finalmente se realizó la cuantificación mediante el equipo Q-Exactive de Thermo Fisher (Figura 3.5) que se compone de un Espectrómetro de Masas acoplado a Cromatografía Líquida de Alta Resolución (UHPLC-MS).



Figura 3.5. Equipo Q-Exactive (UHPLC-MS).

### 3.8 Tinción GUS y visualización en lupa

Las tinciones GUS se realizaron para localizar *in situ* el IAA y las GAs, en líneas donde se ha introducido una construcción indicadora DR5-GUS que responde al IAA y líneas con la construcción indicadora 20ox1-GUS que responde a GAs, respectivamente.

Para la realización de las tinciones se utilizaron las líneas MT-DR5::GUS, *pro*-DR5::GUS, L19-DR5::GUS y MT-20ox1::GUS. Las muestras consistían en el tallo entero, cortado por encima de los cotiledones y por debajo de la HS. Además, se eliminaban todas las hojas dejando solamente  $\leq 0,5$  cm del peciolo de la misma. Las muestras fueron tomadas en dos periodos de tiempo, al mes de ser plantadas (antes de ramificar) y a los 2 meses (después de ramificar). En el caso de las líneas que no ramifican solo se tomo una de las muestras, la correspondiente a los 2 meses. La solución de tinción empleada aparece en la tabla 3.2. El protocolo seguido para la toma de muestras y realización del experimento se muestra a continuación:

- Recoger el tejido en el invernadero y colocarlo en acetona fría al 90%. Dejar en hielo.
- Prefijar el tejido colocando el material a temperatura ambiente durante 20min.
- Lavar con agua destilada.
- Lavar con la solución de tinción (sin X-Glc).
- Sustituir la solución de tinción sin X-Glc por la solución de tinción con X-Glc.
- Infiltrar en vacío durante 10min, asegurándose que los tejidos se encuentren sumergidos en la solución.
- Incubar a 37°C y en oscuridad durante toda la noche.
- Lavar en series de etanol durante 20min cada una:
  - 20%
  - 35%
  - 50%
  - 70%
  - Colocar en solución de hidrato de cloral durante 24h.
  - Lavar con etanol al 70%
  - 80%
  - 90%
  - 100% dejar una noche
- Llevar progresivamente de 100% hasta 70% de etanol.
- Realizar cortes del tallo en cada uno de los brotes de forma longitudinal y transversal.
- Visualizar en lupa.

Tabla 3.2. Solución de tinción (100ml= 50ml para lavado (sin X-Glc) + 50ml para tinción).

0,2 Tritón X-100	2ml stock 10%
50mM tampón fosfato sódico pH 7,2	5ml stock 1M
5mM ferrocianuro	500µl stock 100mM
5mM ferricianuro	500µl stock 100mM
2mM X-Glc	1ml stock 100mM

### 3.9 Obtención y rastreo de dobles mutantes (*Screening*)

Se estudió el fenotipo de plantas dobles mutantes (Figura 3.7), alteradas en la respuesta a las distintas hormonas, para observar si existe algún tipo de interacción entre ellas en el proceso de formación de brotes axilares.

A partir de los mutantes simples hormonales y *ls* se realizaron los cruces que se muestran en la tabla 3.3 mediante polinización manual, es decir, tomando el polen de una de las plantas implicadas en el cruce, con ayuda de un porta-objetos, y llevándolo al estigma de la otra planta del cruce. Las dos plantas involucradas en el cruce serán los parentales y las plantas obtenidas de ellos serán heterocigotas recesivas o dominantes dependiendo de los parentales, a lo que se conoce como generación o cruce F1. Las semillas obtenidas de dichos cruces se esterilizaron y tras sembrarlas y germinarlas *in vitro*, se seleccionaron 4 plantas de cada cruce que se pasaron a tierra, dónde continuaron su desarrollo en invernadero.

Tabla 3.3. Cruces mutantes F1 y líneas mutantes de las cuales se obtuvieron la generación F2.

MUTANTES F1	MUTANTES F2
<i>procera(pro)</i> x <i>35S::asCCD7</i> (recesivo x dominante)	X
<i>lateral supresor (ls)</i> x <i>35S::asCCD7</i> (recesivo x dominante)	X
<i>35S::20oxidase1 (L19)</i> x <i>35S::asCCD7</i> (dominante x dominante)	
<i>ls</i> x <i>sittiens (sit)</i> (recesivo x recesivo)	X
<i>pro</i> x <i>sit</i> (recesivo x recesivo)	X
<i>diageotropica (dgt)</i> x <i>35S::CKX2</i> (recesivo x dominante)	X
<i>dgt</i> x <i>35S::asCCD7</i> (recesivo x dominante)	X
<i>ls</i> x <i>35S::CKX2</i> (recesivo x dominante)	
<i>35S::CKX2</i> x <i>pro</i> (dominante x recesivo)	X
<i>pro-dgt</i> (doble mutante <i>procera-diageotropica</i> ) x <i>35S::asCCD7</i> (recesivo x dominante)	
<i>dgt</i> x <i>sit</i> (recesivo x recesivo)	X
<i>entire (ent)</i> x <i>pro</i> (recesivo x recesivo)	X
<i>ent</i> x <i>L19</i> (recesivo x dominante)	X
<i>ent</i> x <i>35S::asCCD7</i> (recesivo x dominante)	X
<i>ls</i> x <i>L19</i> (recesivo x dominante)	X
<i>ls</i> x <i>nanG</i> (recesivo x dominante)	X

<b><i>L19 x nanG</i> (dominante x dominante)</b>	<b>X</b>
<b><i>35S::asCCD7 x DR5::GUS</i> (dominante x dominante)</b>	<b>X</b>
<b><i>35S::asCCD7 x 20ox1::GUS</i> (dominante x dominante)</b>	<b>X</b>
<b><i>35S::CKX2 x 20ox1::GUS</i> (dominante x dominante)</b>	<b>X</b>
<b><i>35S::CKX2 x DR5::GUS</i> (dominante x dominante)</b>	<b>X</b>
<b><i>ls x DR5::GUS</i> (recesivo x dominante)</b>	
<b><i>ls x 20ox1::GUS</i> (recesivo x dominante)</b>	
<b><i>pro-dgt x DR5::GUS</i> (recesivo x dominante)</b>	

Se dejaron crecer las plantas F1 y se autopolinizaron, el polen de la propia planta fecunda sus propios estigmas. Las plantas obtenidas a partir de los cruces F1 se denominan generación F2. Tras la obtención de los frutos se siguió el mismo proceso que en el caso anterior pero solo de algunos de estos cruces, se muestran en la Tabla 3.3, con la diferencia de que en este caso se plantaron 48 plantas más 3 plantas control de cada cruce, los parentales, en alveolos (Figura 3.6). El porcentaje esperado de plantas doble homocigotas, dependerá de la información genética y fenotípica de ambos parentales, el cual será de 27 plantas para los cruces dominante x dominante, de 9 plantas para los cruces dominante x recesivo y de 3 plantas para los cruces recesivo por recesivo, de las 48 plantadas en cada caso.

En la generación F3 se realizó un *screening* a todos los cruces F2, en el cual se iban seleccionando las plantas posibles dobles homocigotas y desechando aquellas que fenotípicamente mostraban un fenotipo claramente parental. Para cada uno de los cruces, se guardó un homocigoto parental, como control, de cada uno de los parentales de cada cruce y otro control parental obtenido del experimento, como control interno. Para cada uno de los cruces, el *screening* se realizó en el momento en que se observaban las características fenotípicas típicas de cada mutante. El *screening* de los diferentes mutantes doble homocigotos no pudo completarse en todos los cruces señalados en la Tabla 3.3 ya que el desarrollo vegetativo de algunas líneas mutantes se encuentra muy retrasado en el tiempo.



Figura 3.6. Bandeja de 54 alveolos, completados con el abono.

Finalmente, se estudió la descendencia de las plantas F3 para la identificación correcta de la planta doble mutante. Para ello se plantaron 12 semillas de la F3 seleccionadas.

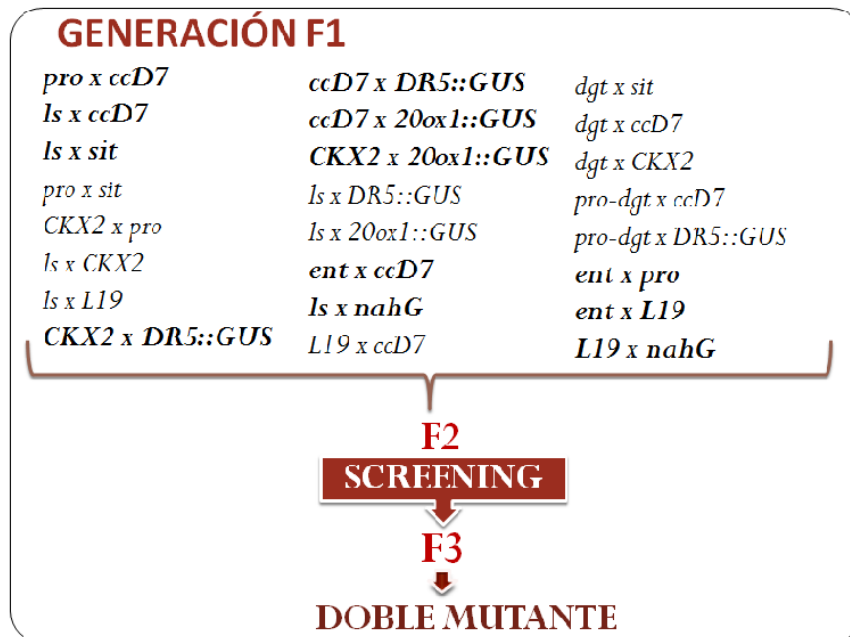


Figura 3.7. Proceso de obtención y rastreo de plantas de tomate doble homocigotas. En la generación F1 aparecen todos los cruces realizados y en negrita de los que se obtuvo la generación F2 y se continuó para el estudio e identificación del doble mutante.

### 3.10 Determinación de la expresión génica

#### 3.10.1 Secuencias de los cebadores

Los cebadores empleados para la realización de las reacciones de RT-PCR fueron diseñados con el programa Oligo 7 Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc. Colorado-USA) y sintetizados en Sigma-Aldrich. Disponemos de 3 parejas de cebadores, cuyas secuencias (Sequence (5'-3')) son las siguientes:

SBRC1A\_587U23: AATCATGTCAACTTATCCACGAA Tm 62.2

SIBRC1A\_664L24: CTGGATGAATTATTGCCCTACGAA Tm 66.5

SIBRC1A.1\_908U29: TTGACTTTAATTTGGTGGATACTAGC Tm 63.1

SIBRC1A.1\_987L24: GAAGTTCGCAAATTGATGCTCTTGA..... Tm 69 // (Son una isoforma del 1A).

SIBRC1B\_154U26: GTTCCCTCGATAGATGATTTGAGTCC Tm 67.5

SIBRC1B\_232L22: CCATTCCTTG TAGTTCGTGGTT Tm 63.8 // (Reconocen ambas isoformas).

### 3.10.2 Kits

- RiboPure™ Kit suministrado por Ambion, AM1924.
- TURBO DNA-free™ Kit suministrado por Ambion, AM1907.
- Amino Allyl MessageAmp™ II aRNA Amplification suministrado por Ambion, AM1753.

### 3.10.3 Enzimas

- GoTaq Hot Start Polymerase suministrada por Promega.
- Turbo DNase suministrada por Ambion.

### 3.10.4 Desarrollo experimental

- Extracción de RNA de brotes axilares.

En la extracción de RNA se tuvo la precaución de usar en todo momento guantes de laboratorio durante el proceso. En primer lugar, se procedió al pesaje de cada una de las muestras para saber de la cantidad de material que se partía (50-100mg de tejido). Las muestras utilizadas fueron brotes axilares del control (MT) y de los mutantes *pro*, *L19*, así como de los tratamientos Mock, (+GA<sub>3</sub>) y PCB. El proceso se llevo a cabo mediante el kit RiboPure™ (Ambion, AM1924). En primer lugar se trituró y homogeneizó la muestra, en condiciones de congelación con nitrógeno líquido, añadiendo 1ml del reactivo TRI con ayuda de un homogeneizador eléctrico. Incubar el homogenizado durante 5min a temperatura ambiente (T.A).

Posteriormente, de este homogeneizado tomamos 0,5ml en un nuevo tubo de 1.5ml, añadimos 100µl de cloroformo y mezclamos en vortex durante 15seg. De nuevo se incubaba durante 5min a T.A y se procede a su centrifugación a 12000xg durante 10min a 4°C. De la fase acuosa transferimos 200µl a un nuevo tubo de 1,5ml.

Finalmente, el RNA se precipita y purifica con 100µl de etanol 100% y mezclamos rápidamente con ayuda de vortex. La muestra se pasa a través de un filtro (Filter Cartridge) que es uno de los tubos que nos proporciona el kit y se cierra la tapa para centrifugar durante 30seg a 12000xg sin temperatura. El líquido que ha atravesado el filtro, es eliminado y se vuelve a poner el filtro en el tubo, ya que el RNA se encuentra atrapado en él. El filtro se lava con 250µl con la solución de lavado y se

centrifuga durante 30seg a T.A hasta que todo el líquido atraviese el filtro. El líquido se vuelve a eliminar y repetimos este lavado una vez más. El filtro lo transferimos a un nuevo tubo de la colección del kit y eluimos el RNA que se encuentra en el filtro con 50µl del tampón de elución. Incubamos 2min a T.A, centrifugamos 30seg para que eluya todo el RNA del filtro. El RNA podrá ser ya guardado a -20°C.

➤ Tratamiento con desoxiribonucleasa (DNAsa I).

El RNA extraído se encuentra contaminado con DNA, y este puede interferir en los análisis de expresión por amplificación del cDNA. Para eliminarlo, utilizamos el kit TURBO DNA-free™ (Ambion AM1907) y seguimos el siguiente procedimiento:

- Añadir 0,1 volúmenes del tampón 10X DNasa TURBO y 1µl de DNasa TURBO para cada muestra de RNA y mezclar vigorosamente.
- Incubar a 37°C durante 20-30min.
- Añadir 0,1 volúmenes del reactivo inactivador de DNasa y mezclar.
- Incubar 5min a T.A e ir mezclando 2-3 veces mientras dure la incubación.
- Centrifugar a 10000xg durante 1,5min.
- Transferir y guardar el RNA, libre de DNAsa a -20°C.

➤ Cuantificación de RNA.

La cuantificación de RNA se realizó con espectrometría a 260nm mediante el aparato NanoDrop-1000 Spectrophotometer UV/Vis (Thermo Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para determinar la pureza del RNA se utiliza la relación de absorbancia 260/280. Esta debe de ser cercana a 2, ya que de otro modo el RNA estará contaminado con proteínas, fenoles u otros que absorben a 280nm o más.

➤ Transcripción inversa de RNAm (RT).

El RNAm transcrito a cDNA (DNA de simple cadena) para posteriormente ser amplificado por PCR y obtener de esta forma una medida de la expresión genética. Para su realización se utilizó el kit Amino AlliyI MessageAmp™ II aRNA Amplification (Ambion AM1753). Para cada muestra se tomaron 11µl de RNA y 1µl del cebador T7 Oligo(dT). La mezcla fue incubada a 70°C durante 10min y se centrifugo durante 5seg. Posteriormente, se realizó la mezcla para la transcripción inversa que se muestra en la tabla 3.4. y se añadió 8µl a cada muestra de dicha reacción. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas 5seg e incubadas a 42°C durante 2 horas.

Tabla 3.4. Mezcla de transcripción inversa para 20µl de reacción.

Componentes	Cantidad
10X First Strand Buffer	2µl
dNTP Mix	4µl
RNase Inhibitor	1µl
ArrayScript	1µl

Para corroborar que habíamos obtenido cDNA realizamos su cuantificación mediante espectrometría a 290nm con el aparato NanoDrop-1000 Spectrophotometer UV/Vis (Thermo Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de fragmentos de cadena sencilla de DNA fue realizada por medio de un termociclador (Eppendorf MasterCycler<sup>TM</sup> Personal) y la enzima Taq-DNA Polimerasa de la casa comercial Promega.

Para la mezcla de PCR, que se muestra en la tabla 3.5, se utilizaron tubos de 0,2ml. Las muestras en el termociclador sufrieron el siguiente proceso:

1. Desnaturalización a 95°C durante 2min.
2. 50 ciclos de amplificación en 3 fases cada uno: primera fase 30" a 95°C para desnaturalización, una segunda fase de hibridación durante 30" a 58°C (temperatura de alineamiento adecuado para la pareja de cebadores) y la tercera etapa de polimerización a 72°C durante 40".
3. Extensión final a 72°C durante 2min.
4. Conservar a 4°C.

Tabla 3.5. Mezcla para la reacción de PCR.

	Concentración Final	Para 25µl (µl)
cDNA	<0,5µg/50µl	1,5
5X Green GoTaq Flexi Buffer	1X	5
MgCl <sub>2</sub>	1-4 mM	1
dNTPs (10mM)	0,2mM cada dNTP	0,5
Cebador 5' (10µM)	0,1-1µM	0,75
Cebador 3' (10µM)	0,1-1µM	0,75
Go Taq Hot Start Polymerase (5u/µl)	1,25u	0,12
Nuclease-Free Water		15,38

Finalmente, el producto de reacción se lleva a un análisis por observación directa de bandas de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa o puede ser conservado a -20°C hasta la realización de dicho análisis.



### ➤ Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis en gel de agarosa permite la separación de los ácidos nucleicos según su tamaño al ser sometidos a un campo eléctrico que les obliga a atravesar la malla formada por el gel de agarosa que retrasa la migración de las moléculas más grandes. Este sistema es adecuado para la separación de moléculas de DNA de tamaños entre 100 - 20.000pb. Se ha utilizado el método descrito por Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989) de Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York.

Se pesa la agarosa necesaria para preparar el porcentaje deseado en el tampón 1x TBE. Tras fundir y atemperar la agarosa en el microondas, se deja atemperar a 50°C y se añade 5µL de bromuro de etidio (10mg/mL) para cada 100mL de volumen total. Se vierte en un molde para preparar geles, en el que se ha colocado previamente un peine para formar los pocillos y se deja enfriar. Una vez solidificado se sumerge el gel en tampón de electroforesis 1xTBE. Los productos de PCR a los que se adicionaron 1/5 volumen del 10xTampón de carga (Azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol FF, 50% glicerol en 1xTE pH 7.4), se pipetea dentro de los pocillos del gel. Se aplica un campo eléctrico al gel de 130V, y el DNA al estar cargado negativamente migrará hacia el electrodo positivo. El tamaño de las bandas amplificadas se compara con un marcador de peso molecular 1Kb DNA Step ladder (Promega G694A). El tamaño de las bandas esperadas para los genes branched analizados en el presente trabajo fue aproximadamente de 77 pb para la pareja de cebadores 1A, 79 pb para los cebadores de la otra isoforma (1A-1) y 78 pb para los cebadores que reconocen ambas isoformas (1B). Para la visualización de las bandas se aplicó luz UV (260nm) por medio de un transiluminador.

### 3.11 Análisis Estadístico

En la realización de cada experimento y posterior análisis estadístico se han utilizado al menos tres réplicas biológicas. Los resultados de todas las gráficas presentadas en la sección de resultados del presente trabajo, han sido sometidas al test *t* de Student mediante el programa estadístico GraphPad QuickCalcs (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ConfInterval1.cfm>, accessed June 2015).

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. CAPÍTULO I. Caracterización fenotípica vegetativa y reproductiva

La morfología de las plantas adultas está regulada hormonalmente. Aunque la caracterización de algunos de los mutantes simples se ha realizado anteriormente en diferentes laboratorios, resulta esencial la caracterización vegetativa y reproductiva de los mutantes hormonales simples en nuestras condiciones de trabajo.

##### 4.1.1 Caracterización Vegetativa

Los resultados observados en la caracterización vegetativa entre las diferentes líneas y la planta control Micro-Tom (MT) fueron los siguientes:

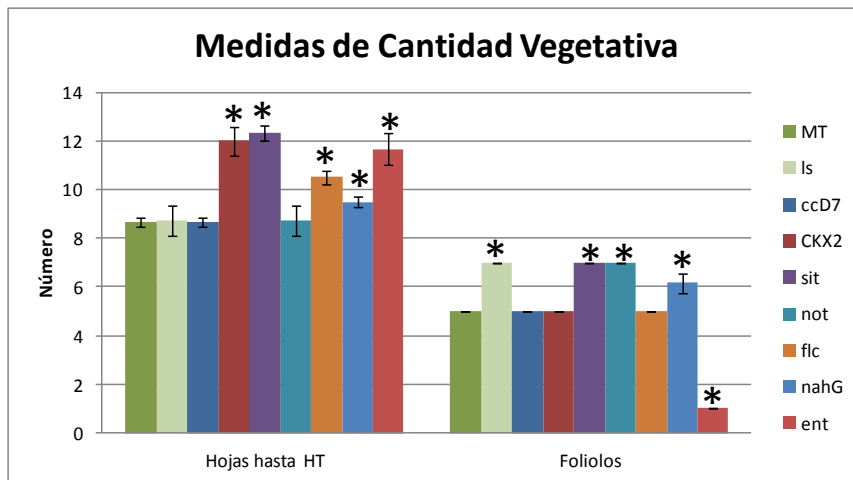
En la Figura 4.5A se muestra el número de hojas hasta la hoja terminal. *ent*, MT-35S::*nahG*, MT-35S::*CKX2*, *sit* y *flc* presentan mayor número de hojas en la planta adulta que los mutantes *ls*, MT-35S::*asccD7* y *not* que poseen la misma cantidad de hojas que MT. El número de folíolos (Figura 4.5A) presenta variaciones en algunos de los mutantes como en el caso de las líneas *ls*, *sit* y *not* que se caracterizan por tener 7 folíolos, *ent* por tener un solo folíolo y MT-35S::*nahG* por tener variación en el número de folíolos en sus plantas con una media de 6 folíolos por planta, mientras el control solo contiene 5 folíolos al igual que en el caso de las líneas MT-35S::*asccD7*, MT-35S::*CKX2* y *flc*. Mientras que para el mutante *ent*, ya había sido reportado la presencia de hojas simples (Dengler 1984), el mayor número de hojas observado en los mutantes *ent*, MT-35S::*CKX2*, *sit* y *flc*, así como el mayor número de folíolos en los mutantes *ls*, *sit*, *not* y MT-35S::*nahG*, han sido descritos en el presente trabajo.

- En la Figura 4.5B se encuentran representadas las medidas de longitud vegetativa cuyos resultados son:
  - En cuanto a la altura, el mutante *ls* tiene una altura mayor a MT mientras que los mutantes *not* y *flc* presentan una altura menor. El resto de mutantes no presentan diferencias significativas.
  - La longitud de la hoja Terminal (HT) en todos los mutantes, excepto en el mutante no hormonal *ls*, fue menor a la planta MT. Con respecto a la anchura de dicha hoja, los mutantes que presentan una longitud significativamente menor son MT-35S::*CKX2*, *sit*, *not* y MT-35S::*nahG*. En el

mutante *flc* no se han podido realizar estas medidas por el elevado grado de deshidratación que presentaba la planta.

- La medida de la longitud del brote axilar correspondiente a la HT-2 solo han mostrado diferencias significativas con respecto a MT: MT-35S::*asccD7*, *flc* (mayor longitud) y MT-35S::*CKX2* (menor longitud). En el mutante *sit* no pudo medirse la longitud de ese brote debido al alto grado de deshidratación que le caracteriza.
- El diámetro del tallo medido no mostró diferencias significativas en las líneas mutantes con respecto al control, excepto en los casos de los mutantes *not*, *flc* y MT-35S::*CKX2* que presentaron un diámetro menor.

A



B

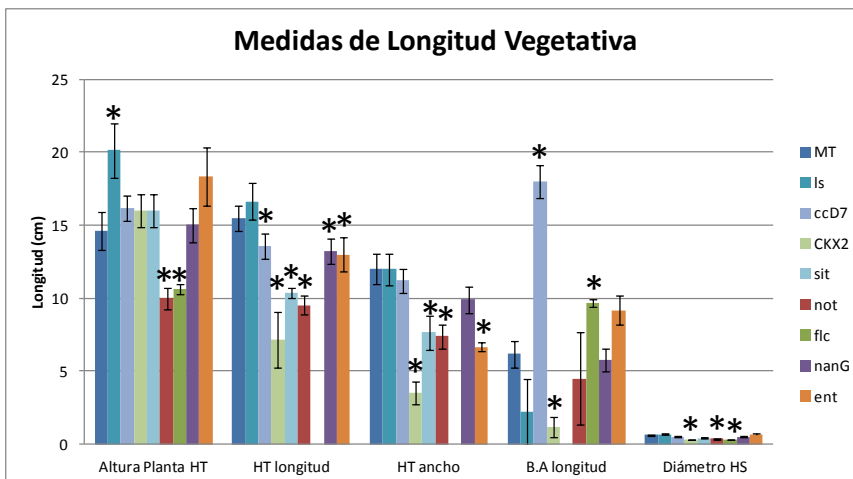


Figura 4.1. Caracterización fenotípica vegetativa en las diferentes líneas mutantes y en el control Micro-Tom. A) Medidas de características vegetales contables y B) Medidas de longitud de las características vegetativas.

Con respecto a los resultados de la longitud en la caracterización vegetativa se puede decir que en las líneas MT-35S::*CKX2*, *sit*, *not* y *flc* se observa un menor tamaño de las hojas lo que es consistente con los estudios realizados por Pino *et al.* (2010) en la línea MT-35S::*CKX2*, así como en las 3 líneas deficientes en ABA (Carvalho *et al.*, 2011), quienes además señalan una reducción en la altura total de la planta.

Una parte esencial de la arquitectura de la planta es la aparición y desarrollo de las ramas laterales. Hasta el momento, el modelo de regulación hormonal de la ramificación lateral solo incluye a las hormonas auxinas y estrigolactonas como inhibidoras y a las citoquininas como estimulantes (Dun *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2013). Las plantas MT-35S::*asccD7* poseen mayor longitud de los brotes axilares que las plantas Micro-Tom, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en tomate por Vogel *et al.* (2010). La longitud del brote axilar del mutante MT-35S::*CKX2* es menor a la del control. Aunque estos resultados parecen diferir a los observados por Pino *et al.* (2010), es importante señalar que las medidas se realizaron en brotes axilares diferentes. Este mutante presenta los brotes axilares más largos en la zona basal (ramificación tipo triangular), mientras que en MT los brotes axilares más largos se encuentran en la zona apical (ramificación tipo triangular invertida). Estos resultados sugieren que la ausencia de citoquininas podría influir en la arquitectura de la ramificación de la planta.

En el caso de los mutantes deficientes en ácido abscísico, el mutante *flc* presentó mayor longitud en el brote axilar medido (brote axilar correspondiente a dos hojas menos a la hoja terminal) que concuerda con lo observado por Tal (1979) Por otro lado, el mutante no hormonal *ls* presentó ausencia de ramificación. Este resultado ha sido descrito por Schumacher *et al.* (1995).

### 4.1.2 Caracterización Reproductiva

Para completar el análisis de las características fenotípicas de cada línea mutante también se realizó una caracterización reproductiva, donde se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 4.2):

- El conteo del nº de frutos en el brote correspondiente a la hoja terminal de los mutantes *ls*, MT-35S::*asccD7* y *flc* fue significativamente menor a la observada en Micro-Tom. El resto de mutantes no mostraron diferencia alguna en este parámetro.
- El peso de los frutos no varía significativamente entre las diferentes líneas mutantes y el control, exceptuando el menor peso de los frutos en el mutante *sit*.

- La cantidad de azúcares solubles ( $\rho$ Brix) en los mutantes estudiados no presentan diferencias significativas con los cuantificados en MT, a excepción del mutante MT-35S::*nahG*, donde se observa una disminución significativa.
- La cantidad de semillas fue significativamente mayor en el mutante MT-35S::*nahG*, triplicando el número de semillas en cada fruto. Por el contrario, el mutante *ls* no presenta semillas en sus frutos, con lo que se trata de un mutante partenocárpico. Además, el mutante *sit* muestra una reducción significativa en el número de semillas con respecto a la planta control.

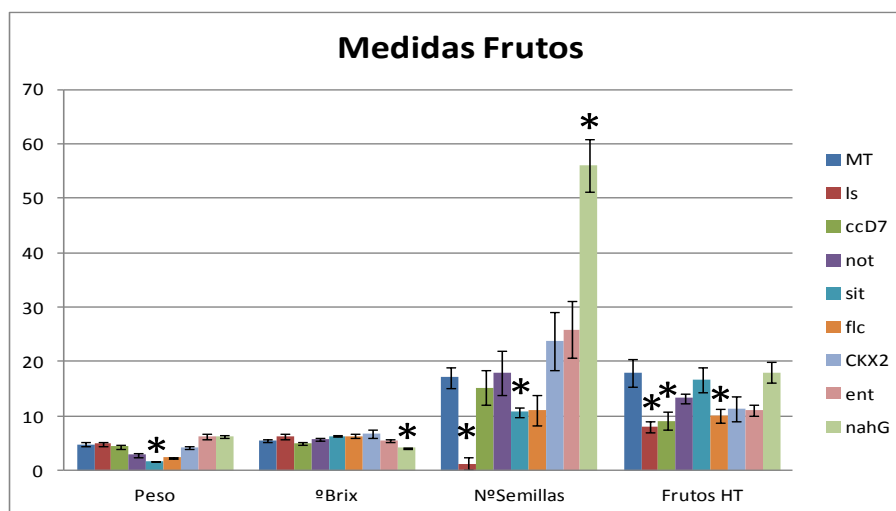


Figura 4.2. Caracterización fenotípica reproductiva en las diferentes líneas mutantes y en el control Micro-Tom.

Los frutos del mutante MT-35S::*nahG* presentan una disminución del contenido en azúcares y una gran cantidad de semillas. El exceso en semillas podría ser debido al déficit que presenta la planta en la hormona ácido salicílico (SA). Al igual que el SA produce una inhibición en la germinación de las semillas (Martín, 2013) podría también estar produciendo una inhibición en la generación de estas dentro del fruto.

Por otro lado, al ácido abscísico (ABA) no se le atribuye ninguna función dentro del desarrollo reproductivo, aún así, los mutantes deficientes en ABA han mostrado algunas diferencias en sus frutos con respecto a los de Micro-Tom. Sin embargo, una de las funciones del ácido abscísico dentro de la planta es la maduración (McCarty, 1995; Zhang *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2007), por este motivo los frutos del mutante *sit* podrían tener menor peso y menor cantidad de semillas.

Otra hormona con ausencia de implicación en la reproducción son las estrigolactonas (SLs), pero el mutante deficiente en SLs (MT-35S::*asccD7*) produce menor cantidad de frutos que Micro-Tom. Se podría hipotetizar que esta línea transgénica está utilizando gran parte de su energía para el desarrollo de los brotes

laterales, y por lo tanto, utilizando menor cantidad para la formación y desarrollo de su parte reproductiva, mientras que la planta control centrará toda su energía en la formación de los frutos y producirá mayor cantidad de estos para asegurar su descendencia.

El mutante no hormonal *ls* presentó frutos con partenocarpia del 100%, característica que no ha sido descrita anteriormente.

### 4.2. CAPÍTULO II. Estudio del fenotipo de ramificación lateral en líneas mutantes hormonales

Si bien el proceso de formación de los brotes axilares es aún bastante desconocido a nivel de señalización hormonal, también es cierto que cada vez son más los estudios que aportan conocimiento sobre la cascada de señales e interacciones entre los diferentes factores, entre ellos las hormonas, que tienen lugar en las yemas axilares de las plantas.

#### 4.2.1. Líneas mutantes hormonales

Las diferentes líneas mutantes hormonales (*MT-35S::asccD7*, *MT-35S::CKX2*, *L19*, *L4*, *MT-jai1-1*, *MT-35S::nahG*, *pro*, *ls*, *dgt*, *pro-dgt*, *ent*, *sit*, *not* y *flc*) se germinaron en medio de germinación y se transplantaron a tierra (6 plantas de cada una) y se dejaron crecer hasta el momento en que todas las hojas habían aparecido, de 7 a 9 hojas dependiendo de cada línea mutante. A partir de ese momento se realizó un seguimiento de la planta para estudiar el momento de aparición de las yemas axilares en las hojas de la planta.

#### 4.2.2. Fenotipo de ramificación en las líneas mutantes hormonales

Una de las respuestas que desencadenan las giberelinas, poco caracterizada hasta el momento, es la ausencia de ramificación lateral. Así pues, se observa que las plantas que sobre-expresan giberelinas o tiene alterada la respuesta a la hormona, presentan ausencia de ramificación lateral. De este modo, se ha estudiado en profundidad esta respuesta en las plantas mutantes hormonales de GAs. Por otro lado, con el objetivo de conocer cómo puede influir la presencia o ausencia de otras hormonas en el proceso de ramificación lateral de la planta, también se ha estudiado este fenotipo en las diferentes líneas mutantes hormonales relacionadas con alteraciones en niveles o sensibilidad a CKs, SLs, ABA, JA, SA e IAA.

Por tanto, se ha estudiado y comparado las medidas del momento de aparición y de la longitud de los brotes laterales, entre las diferentes líneas mutantes hormonales, para profundizar en el conocimiento de éste proceso.

### 4.2.3. Aparición de los brotes axilares

La Figura 4.3 muestra las gráficas de aparición de los brotes axilares de las líneas mutantes hormonales, correspondientes al fenotipo presentado por al menos el 67% de las plantas. En base al inicio de la ramificación observado, las líneas mutantes se han agrupado en 3 gráficas. (A) Mutantes con ramificación adelantada, (B) Mutantes con ramificación nula y (C) Mutantes con ramificación similar o retrasada, todos ellos con respecto a la línea isogénica Micro-Tom (MT), utilizada como el control (Wild-type (WT)).

En la gráfica (A) de la Figura 4.3, se encuentran los mutantes de estrigolactonas (SLs) *MT-35S::asCCD7* y de citoquininas (CKs) *MT-35S::CKX2*. Para el caso del WT se observó que todos los brotes axilares desde la hoja 2 hasta la hoja 6 ya habían aparecido a los 29 días, mientras que existía un cierto retraso en la aparición del brote axilar perteneciente a la hoja 1, donde su aparición se producía 4 días después. Por el contrario, en la línea mutante *MT-35S::asccD7* los brotes axilares de las 6 hojas aparecieron simultáneamente, en los primeros 27 días. Del mismo modo, la línea *MT-35S::CKX2* produce la aparición de los brotes axilares a los 27 días, pero esto solo ocurre en las primeras 4 hojas. En el resto de las hojas, de dicha línea, se observa un retraso en la aparición, produciéndose a los 33 días y 40 días en la hoja 5 y 6, respectivamente. Estos resultados apoyan lo descrito anteriormente por Dun *et al* (2012) y Cheng *et al* (2013) en el caso de las estrigolactonas, ya que podrían estar ejerciendo un papel inhibitorio. Sin embargo, los resultados obtenidos en el mutante deficiente en citoquininas parecen ser contrarios a lo descrito por dichos autores.

Los mutantes de ramificación nula (Figura 4.3B) corresponden a las dos líneas de sobre-expresión de giberelinas *MT-35S::20ox1 (L4 y L19)*, *pro*, línea mutante no hormonal *ls* y el doble mutante *pro-dgt*. Estos mutantes no presentan ramificación lateral en ninguna de sus 6 primeras hojas. Se aprecia una buena correlación entre los altos niveles de GAs (*MT-35S::20ox1\_L4* y *MT-35S::20ox1\_L19*), o modificación de la respuesta a GAs (*pro*) y la ausencia de ramificación lateral. Dichos resultados coinciden con los obtenidos por Schumacher *et al.* (1995) en el mutante *ls*, García-Hurtado *et al.* (2012) en el mutante de sobre-expresión y Carrera, *et al.* (2012) en el mutante *pro*.

Finalmente, en la Figura 4.3C se encuentran los mutantes de ramificación similar al WT o retrasada. El mutante *MT-35S::nahG* muestra un patrón de ramificación idéntico a MT mientras que los mutantes *ent* y *MT-jai1-1* presentan una ramificación

similar pero con la diferencia que las 3 primeras hojas y las 2 primeras hojas aparecen unos días más tarde, respectivamente. El mutante *dgt* presenta un gran retraso en la aparición de ramificación lateral, pues como se observa, ésta tiene lugar 19 días más tarde que MT e incluso este tiempo se incrementa en las hojas más basales de la planta. La línea *sit* también presenta retraso en la aparición de los brotes axilares, pero en este caso, solamente unos pocos días (4-10 días) en las hojas apicales y como máximo 19 días en las hojas basales. Los resultados obtenidos en estas gráficas muestran que los cambios en los niveles de las hormonas SA y JA no alteran la aparición de los brotes axilares. Sin embargo, la baja sensibilidad al IAA y la deficiencia en ABA retrasan la aparición de los brotes axilares en la variedad MT de tomate. A la vista de estos resultados, la hormona ácido abscísico podría tener un papel en el proceso de ramificación lateral como Rameau, *et al* (2015) han citado. Del mismo modo, ni en nuestros resultados ni en evidencias bibliográficas existen datos donde las hormonas SA y JA se encuentren implicadas en el proceso de ramificación.

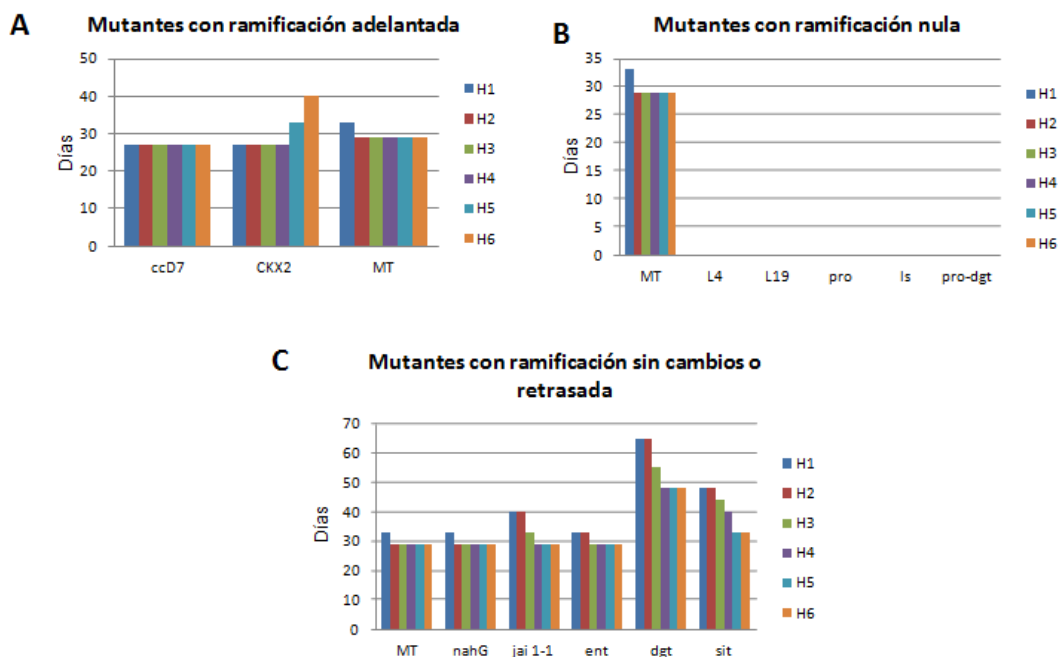


Figura 4.3. Momento de aparición del brote axilar desde la hoja basal (H1) a la más apical (H6), de las líneas mutantes hormonales y del control Micro-Tom (MT). Mutantes con ramificación (A) adelantada, (B) nula y (C) similar o retrasada respecto a MT.



4.2.4. Longitud de los brotes axilares

La variedad MT sigue el patrón de ramificación tipo triangular invertido (Figura 4.4). Desde la hoja basal hasta la apical se va produciendo sucesivamente un aumento en la longitud de los brotes axilares, con la excepción del brote perteneciente a la hoja 5. Este brote presenta una disminución en su crecimiento debido a una posible “penalización” producida por su posición en la planta, se sitúa entre 2 hojas (H3 y H6) que necesitan de una elevada energía para el desarrollo de sus brotes axilares.

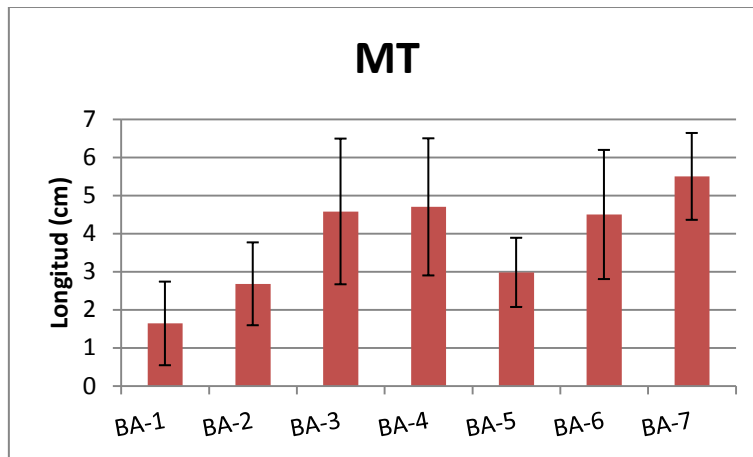


Figura 4.4. Longitud de las ramificaciones de la variedad MT.

Los mutantes hormonales MT-35S::*asccd7* y MT-35S::*CKX2* presentan un patrón de ramificación en forma triangular (Figura 4.5. A y B, respectivamente). Estos mutantes, muestran una mayor longitud de los brotes axilares en las hojas basales con respecto a las apicales. Además, cabe resaltar en la línea MT-35S::*asccd7* el mayor desarrollo que poseen sus brotes laterales, ya que el brote más corto de éstas es mayor incluso que el brote más largo de MT.

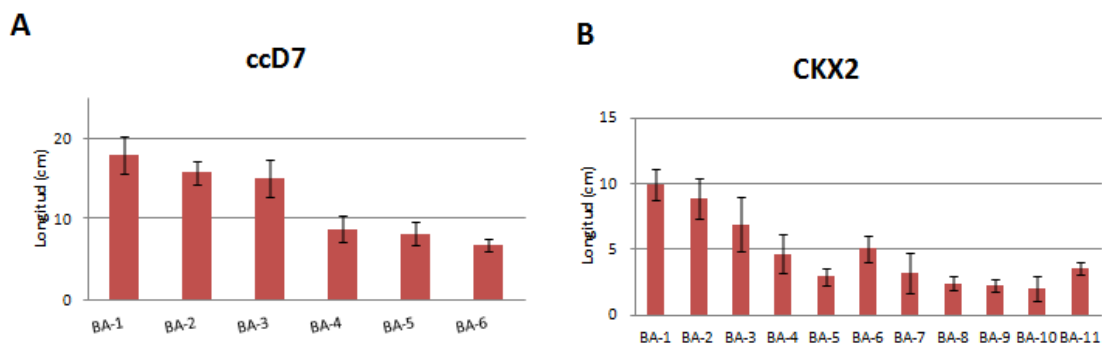


Figura 4.5. Longitud de las ramificaciones de mutantes con patrón triangular. Representación de la longitud de todos los brotes axilares hasta la hoja terminal (HT), donde el BA-1 es el brote axilar más basal, y así sucesivamente. A) Línea mutante MT-35S::*asccd7* (*ccD7*) y B) Línea mutante MT-35S::*CKX2* (*CKX2*).

Por otro lado, los mutantes hormonales de ácido jasmónico (JA): *MT-jai1-1*, ácido abscísico (ABA): *sit* y auxinas (IAA): *ent* y *dgt*; presentan un patrón de ramificación triangular invertido (Figura 4.6.A, B, C y E respectivamente).

La línea mutante *MT-jai1-1* y *ent*, siguen un patrón triangular invertido idéntico al observado en MT, mientras que el mutante *dgt* presenta una menor longitud en sus brotes con respecto a lo observado en el control (Figura 4.6C).

El mutante *sit* presenta un patrón de ramificación tipo triangular invertido (Figura 4.6.E) similar al de MT, aunque la deshidratación característica de esta línea dificulta el desarrollo de los brotes axilares y por ello muestran una menor longitud.

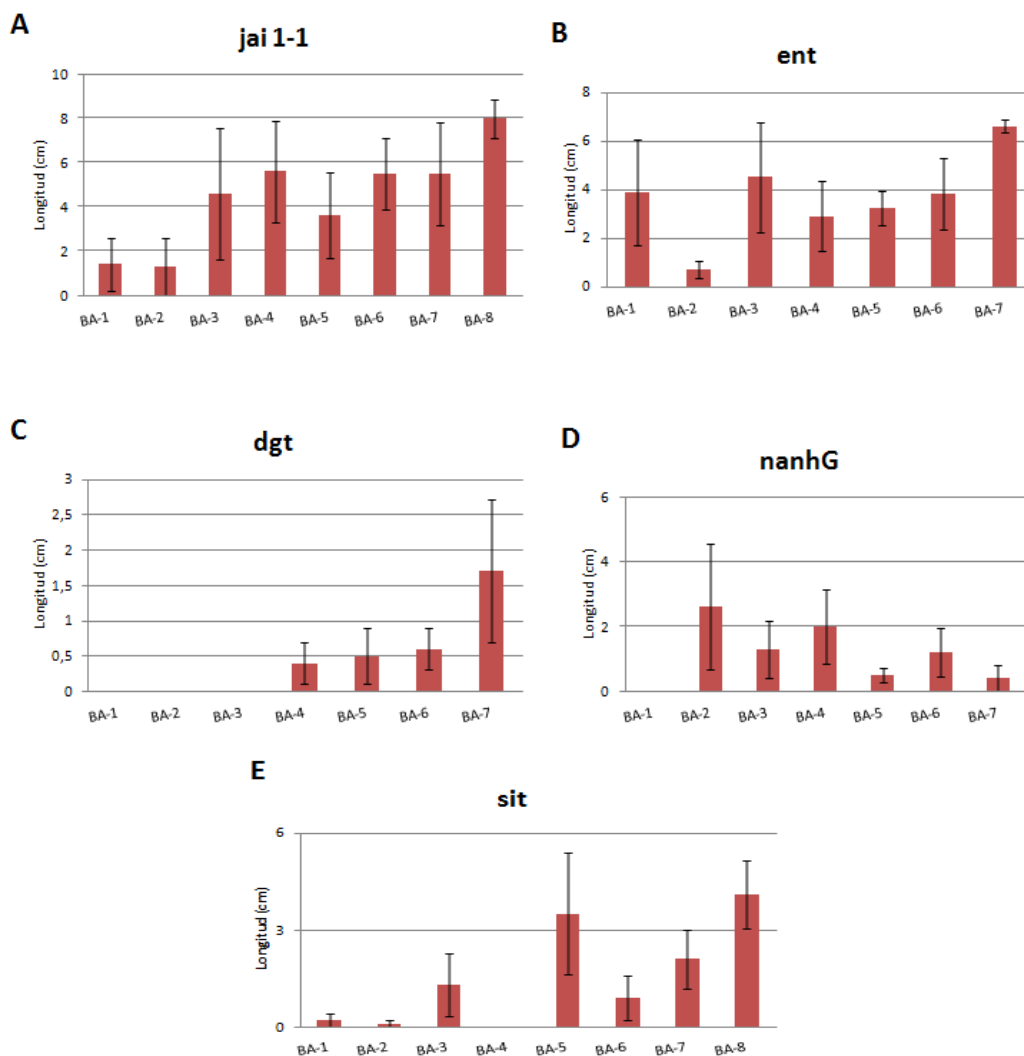


Figura 4.6. Longitud de las ramificaciones de mutantes con patrón triangular invertido. Representación de la longitud de todos los brotes axilares hasta la hoja terminal (HT), donde el BA-1 es el brote axilar más basal, y así sucesivamente. A) Línea mutante *MT-jai1-1* (*jai1-1*), B) Línea mutante *entire* (*ent*), C) Línea mutante *diageotrópica* (*dgt*), D) Línea mutante *MT-35S::nahG* (*nahG*) y E) Línea mutante *sittiens* (*sit*).

Con respecto a la línea mutante deficiente en ácido salicílico (SA) MT-35S::*nahG* no presenta ni el patrón de ramificación triangular ni el triangular invertido descritos hasta el momento, ya que se ha observado que la longitud de sus ramificaciones es muy variable en todos los experimentos realizados (Figura 4.6.D).

Los resultados obtenidos indican que los cambios en los niveles de las hormonas SLs y CKs, pueden participar en alterar el patrón de ramificación de la variedad MT de forma triangular invertida (hojas apicales más largas que basales) a triangular (hojas basales de mayor longitud que las apicales). Por otro lado, el resto de hormonas (JA, SA, ABA e IAA), no alterarían dicho patrón.

### 4.3. CAPÍTULO III. Localización de auxinas y giberelinas en la planta

El gen delator GUS, proveniente de *Escherichia coli*, codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa y se caracteriza porque su expresión es detectada fácilmente en el tejido. La expresión de dicho gen, se hace evidente por el color azul que adquiere la célula transformada debido a la hidrólisis del sustrato colorigénico 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucoronide (X-Glu) (Naleway, 1992; Chi et al., 1998). La importancia de utilizar el gen GUS como indicador, radica en que las plantas tienen una baja o nula actividad endógena detectable de esta enzima.

Para la presente memoria se trabajó con plantas portadoras de la construcción DR5::*GUS* y *20ox1*::*GUS*, las cuales son reporteros inducibles por las hormonas auxina y giberelina, respectivamente. Estas construcciones aportan datos sobre la localización y/o síntesis de dichas hormonas, lo que proporcionará información para dilucidar lo que podría estar ocurriendo en las yemas axilares.

El conjunto de líneas deladoras (MT-DR5::*GUS*, *pro*-DR5::*GUS*, *L19*-DR5::*GUS* y *MT-20ox1*::*GUS*\_LA1) de plantas de tomate Micro-Tom fueron teñidas con el sustrato X-Glu y decoloradas, para visualizar con mayor claridad el lugar donde se localizan las auxinas o las giberelinas. Se plantaron 4 plantas de cada línea deladora y del control Micro-Tom y se les realizó la tinción a 2 plantas de 1 mes de edad (antes de la ramificación) y a 2 plantas de 2 meses de edad (ramificadas), de cada línea y del control (Figura 4.7).

ANTES RAMIFICACIÓN



CON RAMIFICACIÓN



CON RAMIFICACIÓN

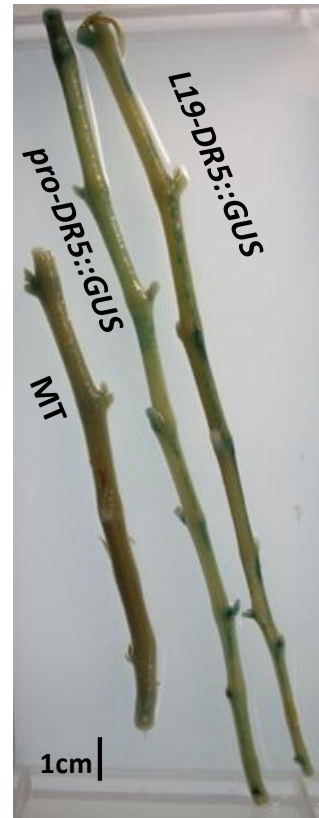


Figura 4.7. Control de la expresión GUS en plantas de tomate Micro-Tom y líneas deladoras MT: DR5::GUS, 20ox1::GUS, *pro-DR5::GUS* y *L19-DR5::GUS* de 1 mes (antes de ramificar) y 2 meses de edad (ramificadas).

La planta control MT no es portadora de ninguna de las dos construcciones por ello no expresa la coloración azul o muy débilmente, causada por la actividad endógena de la enzima. En la Figura 4.8 se puede observar con detalle el lugar de la planta donde están localizadas la hormona IAA y GAs. En el caso del IAA la línea deladora DR5::GUS muestra una localización en el interior del tallo y que podría coincidir con en el lugar de inicio del brote axilar. Los resultados indican que la auxina no estaría entrando dentro del brote, sino que se acumula en el exterior de éste. Dichos resultados coinciden con los obtenidos por Leyser y Day (2003). Por otro lado, la línea deladora 20ox1::GUS muestra que las GAs se encuentran distribuidas dentro de toda el área del tallo, pudiendo coincidir con los vasos vasculares.

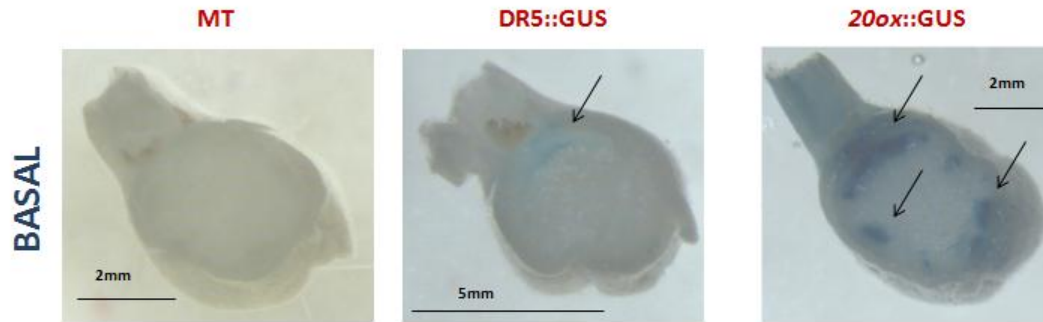


Figura 4.8. Localización hormonal (IAA y GAs) en plantas de tomate mediante visualización en lupa. Corte transversal del tallo en plantas: Micro-Tom y líneas deladoras MT: DR5::GUS y 20ox1::GUS.

La Figura 4.9 muestra los cortes longitudinales en 3 zonas del tallo (apical, intermedio y basal) antes y después de que se produzca la ramificación de cada una de las plantas. En la línea DR5:GUS se observa como las auxinas se acumulan en la zona apical y podrían circular desde ésta a la parte inferior de la planta, ya que antes de la ramificación aparece una acumulación de la hormona en la zona apical y ésta señal se va perdiendo con el paso del tiempo, tanto en la parte superior como en la intermedia, acumulándose en la zona basal, resultados concordantes con los obtenidos por Robert y Friml (2009) . La señal del IAA es mayor en las plantas de mayor edad que en las jóvenes. En ambos tiempos, se mantiene que la auxina permanece acumulada en el inicio del brote y por tanto, el IAA podría estar controlando el movimiento desde la raíz hacia arriba de una señal o segundo mensajero que pudiera estar introduciéndose dentro del brote axilar y regulando su desarrollo. Esta hipótesis sería apoyada por el modelo clásico de dominancia apical (Rameau, *et al.* 2015). Por otro lado, las giberelinas distribuidas en todo el tallo y en el interior del brote axilar se pueden ver en la línea 20ox1::GUS, en el momento anterior a la ramificación, ya que esta señal va perdiendo su intensidad una vez la planta ha ramificado. En la parte intermedia de la planta ramificada, se aprecia el brote axilar y además, que las giberelinas se encuentran en baja concentración. Las GAs están acumuladas en la parte basal de la planta, inhibiendo la ramificación como se aprecia en la imagen de la zona basal en dicha línea. Consecuentemente, los resultados obtenidos indican que las GAs podrían estar implicadas en la inhibición de la aparición y desarrollo de los brotes axilares, y por tanto estarían implicadas en el proceso de ramificación lateral y apoyarían los estudios realizados por Rameau *et al.* (2015).

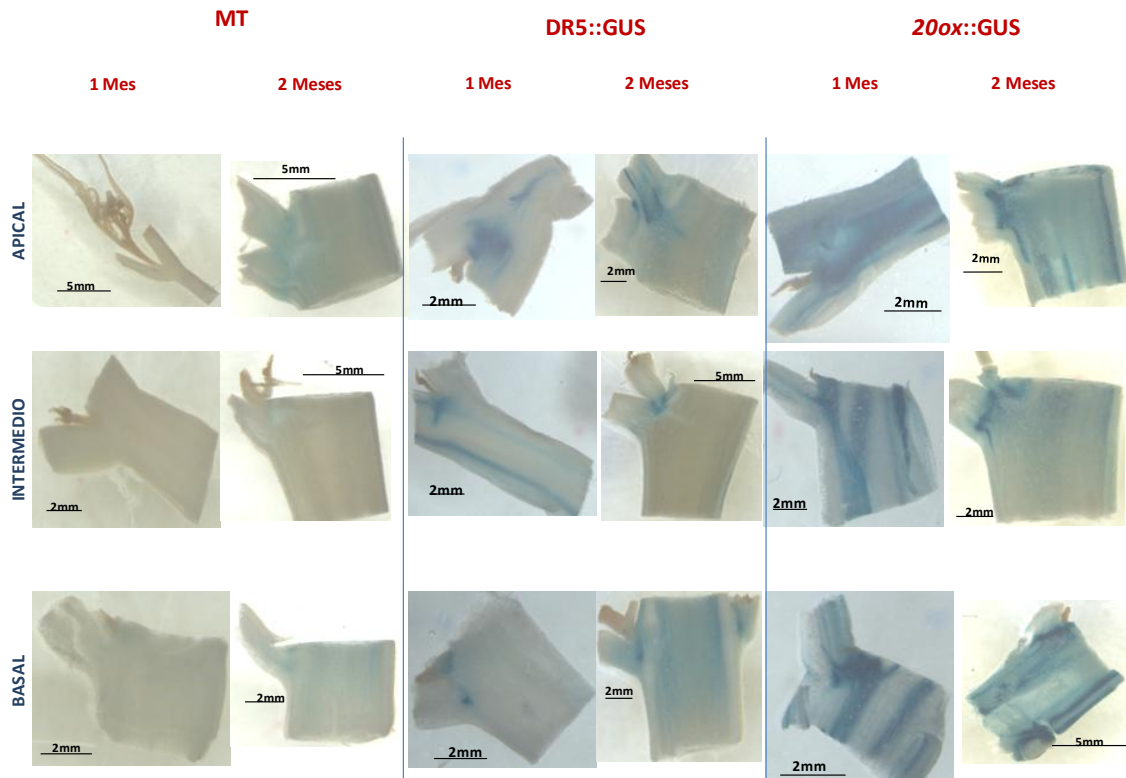


Figura 4.9. Visualización en lupa de la expresión GUS en la planta de tomate Micro-Tom y las líneas delatora DR5::GUS y 20ox1::GUS. Cortes longitudinales de la zona apical, intermedia y basal del tallo de las distintas líneas.

Las líneas *L19-DR5::GUS* y *pro-DR5::GUS* poseen ramificación nula ya que presentan por un lado la sobre-expresión de la hormona giberelina y por otro lado la respuesta alterada a esta hormona. En las líneas *L19-DR5::GUS* y *pro-DR5::GUS* se pretende interpretar como la presencia de mayores niveles de giberelinas (GAs) o su respuesta, puede alterar la localización del ácido indolacético (IAA) antes o después del inicio de la ramificación. En este caso, se toma como control la línea delatora DR5::GUS. Las plantas de 2 meses, por tanto ramificadas, de la línea DR5::GUS aparentemente (Figura 4.10) no muestran diferencias con las plantas de la misma edad de las líneas de ramificación nula. De igual modo, no se observan diferencias entre las distintas partes del tallo (basal, intermedio y apical) en ambas líneas, ya que las auxinas se encuentran localizadas en el inicio del brote axilar en las tres zonas como ocurre en el control. A la vista de estos resultados, posiblemente, la respuesta a IAA no se ve alterada por un incremento en los niveles de GAs. Según Rameau, *et al.* (2015) se podría esperar que si las GAs estuvieran actuando estabilizando las proteínas PIN (transportadores de auxinas), los mutantes con los niveles de GAs alterados podrían tener alteraciones detectables en el gradiente de auxinas. Sin embargo, a la vista de nuestros resultados, esta suposición probablemente no estaría ocurriendo y la posible interacción entre las giberelinas y las auxinas está aún por determinar.

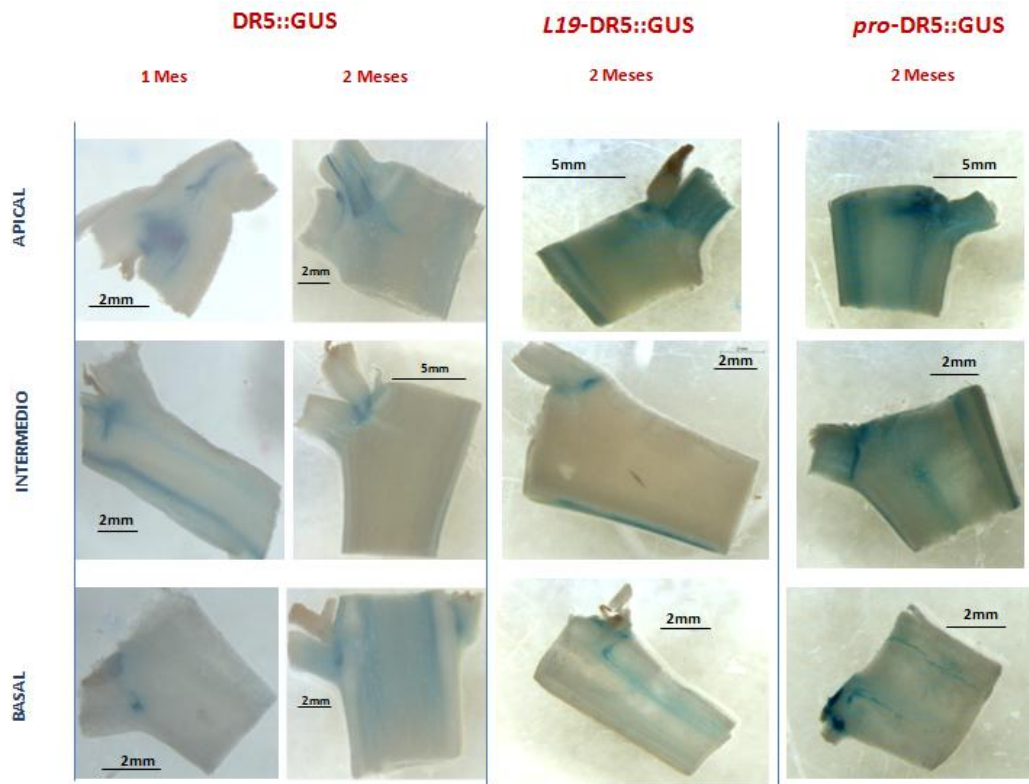


Figura 4.10. Visualización en lupa de la expresión GUS en las líneas deladora DR5::GUS y L19-DR5::GUS y *pro*-DR5::GUS. Cortes longitudinales de la zona apical, intermedia y basal del tallo de las distintas plantas.

#### 4.4. CAPÍTULO IV. Respuesta del mutante deficiente en estrigolactonas (*MT-35S::asccD7*) al tratamiento hormonal con giberelinas (GAs)

La construcción de las plantas *MT-35S::asccD7*, consiste en una transgénesis mediante introducción de una construcción antisentido, con lo que la inhibición del gen endógeno no es completamente letal, con pequeñas dosis del gen endógeno los niveles de estrigolactonas (SLs) no son del todo nulos. Con el objetivo de predecir el fenotipo relacionado con la ramificación, en los cruces de las líneas *pro* y de sobre-expresión de la 20ox, donde dicha línea transgénica se encuentre implicada. De este modo, mediante la realización de tratamientos hormonales por riego y pulverización, se podría conocer el fenotipo del doble mutante entre *MT-35S::asccD7* y la línea de sobre-expresión de giberelinas (*MT-35S::20ox1\_L19*).

Se realizaron tratamientos hormonales con ácido giberélico 3 (GA<sub>3</sub>), con paclobutazol (PCB), un inhibidor de la biosíntesis de GAs, así como el tratamiento conjunto (PCB+GA<sub>3</sub>). Como control se realizó un tratamiento mock donde la solución de trabajo llevaba el etanol correspondiente en que se encuentran disueltos el GA<sub>3</sub> y el



PCB, pero sin los componentes hormonales. Para cada tratamiento se utilizaron 6 plantas de las líneas MT y MT-35S::*asccD7*.

En la Figura 4.11 aparecen los controles de MT y de la línea transgénica, los cuales han sido tratados con la solución *mock* y nos servirán para asegurar que los cambios fenotípicos observados con los tratamientos hormonales son debidos a la hormona y no al disolvente. No obstante, todas las plantas MT-35S::*asccD7* presentan una mayor ramificación con respecto a la observada en las plantas MT.

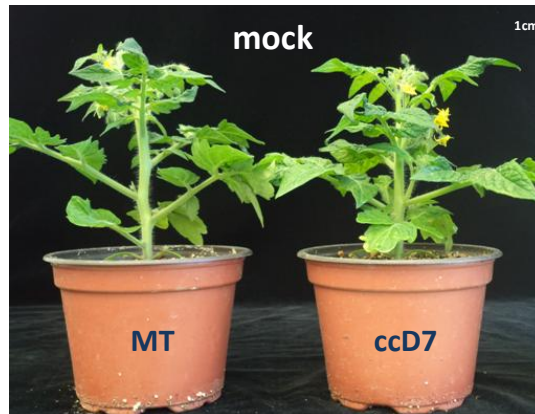


Figura 4.11. Tratamiento con la solución *mock* en plantas de tomate Micro-Tom y en la línea transgénica MT-35S::*asccD7*.

El tratamiento con GA<sub>3</sub> produce inhibición en la ramificación tanto en las plantas control MT como en el mutante MT-35S::*asccD7* (Figura 4.15.C). En la Figura 4.12 además de la ausencia de ramificación en las plantas tratadas, se observan otros rasgos fenotípicos característicos de la acción del ácido giberélico (Thomas y Hedden, 2006): las hojas forman un ángulo menor con el tallo (45°), poseen un color más claro (verde-amarillo) y mayor número de hojas que las plantas control (Figura 4.15.B), además de una mayor altura final (Figura 4.15.A). Estas características fenotípicas se observan en ambas líneas.

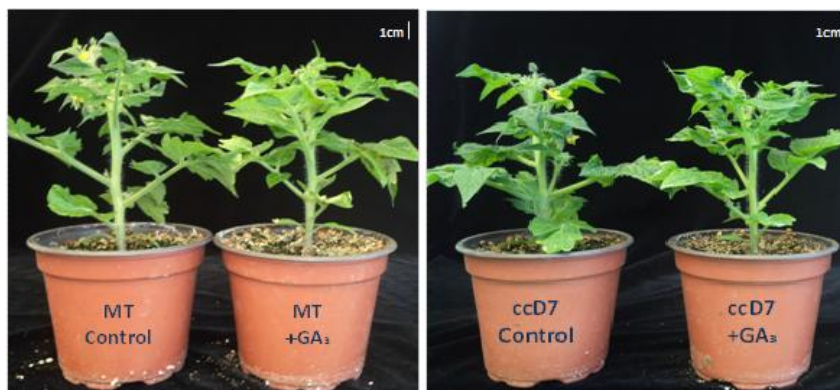


Figura 4.12. Tratamiento con ácido giberélico 3 (GA<sub>3</sub>) en plantas MT y en la línea transgénica MT-35S::*asccD7* y sus respectivos controles en ausencia de tratamiento.



En la Figura 4.13 las plantas MT y la línea MT-35S::asccD7, tratadas con PCB, presentan el fenotipo típico de plantas con niveles reducidos de GAs activas (Koorneef y Van der Veen, 1980). Muestran enanismo (Figura 4.15.A), una tonalidad más oscura en sus hojas, adelanto en el tiempo de ramificación (Figura 4.15.C) y una mayor vigorosidad de sus brotes laterales en contraste con sus respectivas plantas control (Figura 4.11).

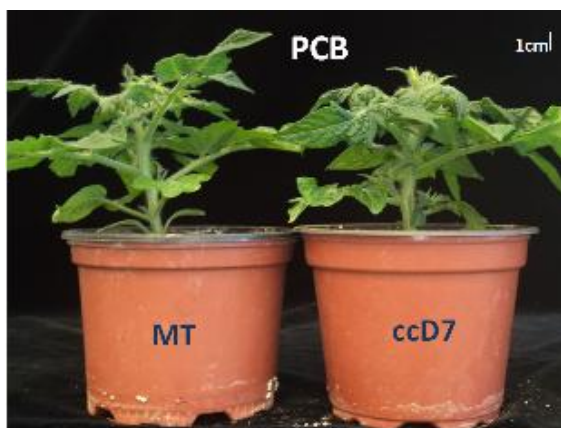


Figura 4.13. Tratamiento con paclobutazol (PCB) en plantas MT y en la línea transgénica 35S::asccD7.

El tratamiento conjunto de PCB y GA<sub>3</sub> (Figura 4.14) proporciona a las plantas, tanto a MT como a MT-35S::asccD7, ausencia de ramificación lateral (Figura 4.15.C), mayor número de hojas (Figura 4.15.B) y una coloración similar a las plantas tratadas con GA<sub>3</sub> (Figura 4.12). Sin embargo, la altura final se mantiene aproximadamente igual a la altura de las plantas control (Figura 4.15.A). Se observa que el fenotipo causado por PCB (enanismo, tonalidad oscura de las hojas, adelanto y mayor vigorosidad de la ramificación lateral), es revertido cuando las plantas son tratadas conjuntamente con PCB+GA<sub>3</sub>. Del mismo modo, los resultados obtenidos por Brian, *et al.* (1954) y Phinney (1956) mostraron que el ácido giberélico restauraba los defectos del crecimiento en los mutantes enanos de guisante y de maíz, respectivamente.

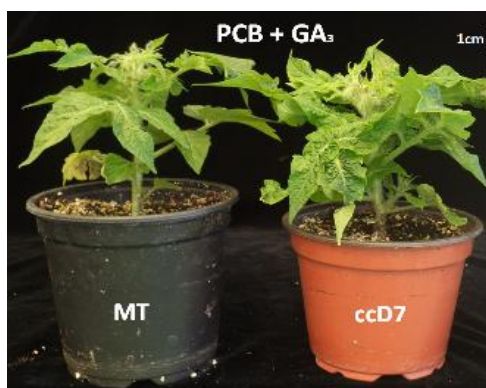


Figura 4.14. Tratamiento con paclobutazol (PCB) y ácido giberélico 3 (GA<sub>3</sub>) en plantas MT y en la línea transgénica MT-35S::asccD7.

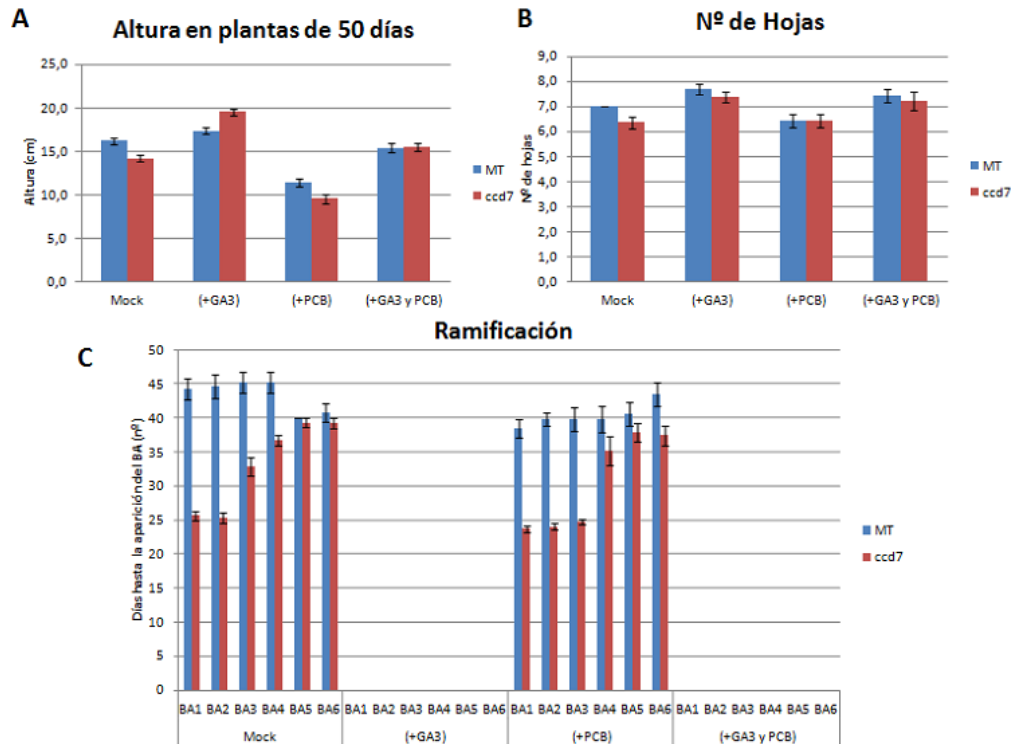


Figura 4.15. Datos estadísticos del fenotipo de las plantas Micro-Tom y la línea transgénica MT-35S::*asccD7* tratadas con GA<sub>3</sub>, PCB y ambos simultáneamente en comparación con sus controles (mock). A) Altura de las plantas a los 50 días, B) Número de hojas y C) Tiempo de inicio de la ramificación.

Estos resultados sugieren, que el doble mutante MT-35S::20ox1\_L19 x MT-35S::*asccD7*, presentará ausencia de ramificación al igual que ocurre en el mutante deficiente en estrigolactonas (SLs) cuando es tratado con GA<sub>3</sub>. Además, el efecto de inhibición de la ramificación lateral estaría mediado por las giberelinas, lo que es consistente con los resultados obtenidos por Martínez (2014) en sus tratamientos exógenos con PCB sobre la línea transgénica 35S::*shRNA2ox*, la cual presenta silenciamiento génico de las enzimas catabólicas GA2ox.

#### 4.5. CAPÍTULO V. Cuantificación hormonal (qH)

Dado que la aparición de los brotes axilares en los diferentes mutantes utilizados en el presente trabajo presenta una gran variación durante el desarrollo de la planta, ha sido necesario utilizar dos controles Micro-Tom de diferentes edades. La cuantificación hormonal comparativa en MT en diferentes estados del desarrollo (29 y 45 días), resulta esencial para profundizar en el conocimiento de este proceso del desarrollo. La cuantificación hormonal se realizó tanto en plantas con ramificación diferente a Micro-Tom (MT) (35S::*asccD7*, 35S::*CKX2*, L19 y L4, *Is*) como en plantas de ramificación similar (*sit*).

Para la realización del experimento se tomaron muestras de tres tejidos diferentes de la planta: brotes axilares 3 y 4, entrenudo 3 y pedúnculos 3 y 4. Estos fueron tratados en condiciones de frío y su cuantificación hormonal se realizó mediante un sofisticado aparato llamado Q-exactive que utiliza una combinación de cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas (UHPLC-MS).

### *4.5.1 Cuantificación hormonal de plantas jóvenes (29 días) y adultas (45 días) de Micro-Tom.*

La cuantificación hormonal en la línea Micro-Tom, se realizó tanto en plantas jóvenes de 29 días, las cuales están finalizando su desarrollo vegetativo pero no están preparadas para iniciar la ramificación lateral, como en plantas adultas de 45 días, las cuales han iniciado su desarrollo reproductivo y la aparición de brotes axilares puede tener lugar. Las cuantificaciones hormonales se han realizado en brote axilar (B.A), entrenudo (E) y pedúnculo (P).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.16, donde se puede observar una disminución significativa de las giberelinas activas ( $GA_1$  y  $GA_4$ ) en todos los tejidos de la planta adulta con respecto a la planta joven, esto nos indica que en la planta joven los niveles de GAs son necesarios, dado que son tejidos que están creciendo y desarrollándose mientras que cuando la planta ha cesado su crecimiento, los requerimientos de GAs ya no son necesarios y por ello los niveles se reducen drásticamente, como se observa. Como consecuencia de estos altos niveles de GAs, estas podrían estar actuando como represoras del inicio de la formación de los brotes axilares como ya ha sido discutido por otros autores (Rameau *et al.* (2015) y Martínez (2014)) y en los resultados anteriores del presente trabajo. Por otro lado, los niveles de auxinas se encuentran incrementados en la planta adulta con respecto a la planta joven, lo cual podría ser debido a que el IAA sería necesario para generar o controlar una señal o a un segundo mensajero que pudiera introducirse dentro del brote axilar y regular su desarrollo. Esta hipótesis ha sido propuesta en el apartado 4.3 CAPÍTULO III. Localización de auxinas y giberelinas en la planta de este trabajo y sería apoyada por el modelo clásico de dominancia apical (Rameau, et al. 2015). De igual modo los niveles de ácido abscísico son mayores en la planta adulta, pero estas plantas aún no han empezado a ramificar por que el ABA podría estar ejerciendo un papel represor sobre la ramificación. Se puede especular que estos niveles podrían verse reducidos una vez se inicie la aparición de los brotes axilares.

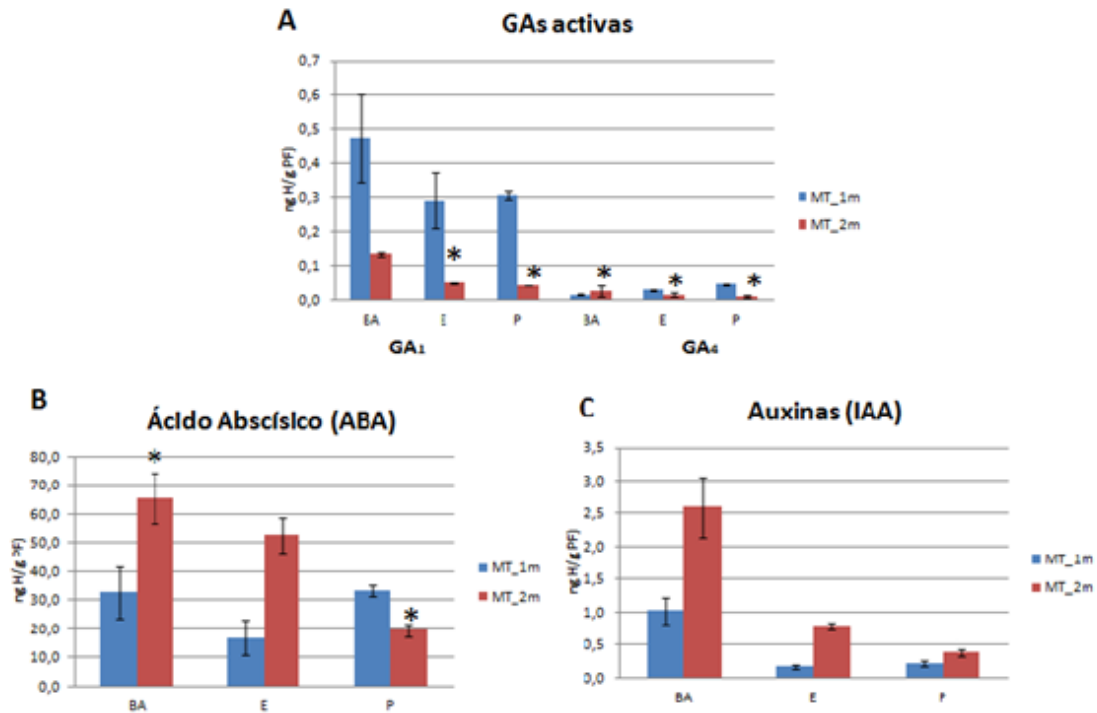


Figura 4.16. Cuantificación hormonal en brote axilar (B.A), entrenado (E) y pedúnculo (P) de plantas jóvenes (29 días) y adultas (45 días) de la variedad de tomate Micro-Tom. Tipo de hormona: A) Giberelinas activas (GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>), B) Ácido abscísico (ABA) y C) Auxinas (IAA).

#### 4.5.2 Cuantificación hormonal de mutantes con ramificación nula

Existen dos tipos de mutantes con ramificación nula, los mutantes hormonales de las líneas de sobre-expresión de giberelinas, portadoras de la construcción *35S::20ox1, L19* y *L4*; y el mutante no hormonal, *ls*.

##### A. Mutantes hormonales.

La Figura 4.17 presenta unos niveles mayores de las giberelinas activas (GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>) en las líneas *L19* y *L4* que en el control MT. Sin embargo, en el brote axilar aparece una menor concentración de GA<sub>1</sub> en las líneas sobre-expresoras de giberelinas que en MT, aproximadamente la mitad para *L19* y tres veces menor para *L4*. Por lo tanto, la GA<sub>4</sub> podría ser la implicada en la inhibición del brote axilar debido a las diferencias observadas tanto en el brote axilar como en los tejidos circundantes, pedúnculo y entrenado. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos por Martínez (2014).

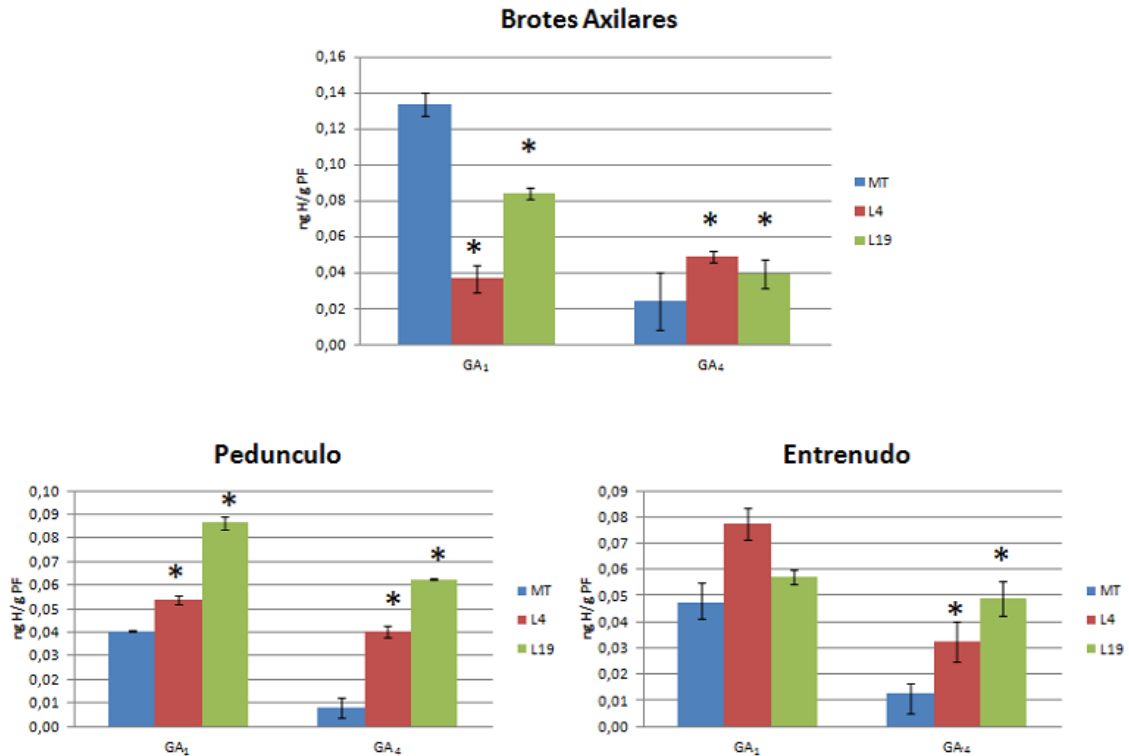


Figura 4.17. Cuantificación hormonal de las giberelinas activas (GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>) en brote axilar 3 y 4 (B.A), entrenudo 3 (E) y pedúnculo 3 y 4 (P) de plantas de la variedad de tomate Micro-Tom y los mutantes hormonales con ramificación nula (L4 y L19).

En la tabla 4.1B podemos encontrar los valores de cuantificación hormonal de ácido jasmónico (JA), ácido abscísico (ABA) y auxinas (IAA) en los brotes axilares 3 y 4 (B.A), en el entrenudo 3 (E) y en los pedúnculos 3 y 4 (P) de los mutantes hormonales con ramificación nula (L4 y L19). Dichos niveles hormonales presentan diferencias significativas en los tres tejidos en comparación con MT (Tabla 4.1A), excepto la auxina. Se podría hipotetizar que tanto las GAs como el ABA podrían estar ejerciendo un papel represor en la aparición de los brotes axilares en estas líneas. En el caso del ácido jasmónico, que también presenta cantidades mayores, hasta el momento no se le ha asignado un papel claro dentro de la aparición del brote axilar.

B. Mutante no hormonal.

En la Figura 4.18 no se ven diferencias significativas en los niveles de GA<sub>1</sub> en los tejidos analizados excepto una disminución en el entrenudo del mutante no hormonal. En cuanto a la GA<sub>4</sub> se observa un incremento y disminución significativos en el entrenudo y pedúnculo, respectivamente, de *ls* con respecto al control. En el resto de hormonas, no existen diferencias significativas entre el mutante no hormonal *ls* y MT como se puede observar en la tabla 4.1A y C. Al igual que Tucker (1976) observó en sus experimentos, en estas muestras también se ha observado una mayor cantidad de IAA

en pedúnculo y entrenudo, y más GAs en entrenudo. Además, se han observado diferencias en otros tejidos no descritas hasta ahora.

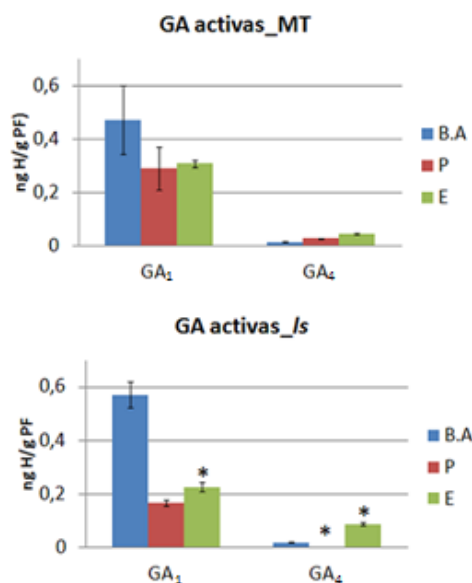


Figura 4.18. Cuantificación hormonal de las giberelinas activas (GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>) en brote axilar 3 y 4 (B.A), entrenudo 3 (E) y pedúnculo 3 y 4 (P) de plantas de la variedad de tomate Micro-Tom y del mutante no hormonal, *lateral suppressor (ls)*.

Tabla 4.1. Niveles hormonales en brote axilar, entrenudo y pedúnculo de los mutantes hormonales de ramificación nula (B), el mutante no hormonal (C) y la planta de tomate Micro-Tom (A).

A

MT				
	ABA	JA	SA	IAA
B.A	32,5± 4,1	1,4±0,3	94,1±3,0	1,0±0,2
P	16,9±1,1	5,4±0,3	20,0±1,5	0,2±0,0
E	33,1±1,4	1,5±0,2	39,5±2,1	0,2±0,0

B

L4			
	ABA	JA	IAA
B.A	48,8± 5,9	45,8±1,8	1,4±0,5
P	47,7±2,0	35,2±1,5	1,4±0,3
E	16,4±1,1	8,3±0,9	0,9±0,1

L19			
	ABA	JA	IAA
B.A	60,8± 3,8	47,1±4,4	1,2±0,2
P	48,1±3,4	26,2±2,3	1,1±0,4
E	20,6±3,4	10,9±1,2	1,3±0,4

C

	<i>ls</i>			
	ABA	JA	SA	IAA
B.A	28,9± 3,7	1,3±0,2	105,9±0,9	0,0±0,0
P	16,6±1,3	2,4±0,1	24,9±0,4	0,3±0,01
E	52,4±3,2	5,7±0,6	48,5±4,6	0,4±0,1

#### 4.5.3 Cuantificación hormonal de mutantes con ramificación adelantada a Micro-Tom

Los mutantes *MT-35S::asccD7* y *MT-35S::CKX2* presentan la ramificación adelantada a Micro-Tom y una mayor cantidad de la giberelina activa  $GA_4$  en todos los tejidos analizados (Figura 4.19). La giberelina  $GA_1$  presenta diferencias significativas en el mutante *MT-35S::asccD7* en el tejido correspondiente al entrenudo y en el mutante *MT-35S::CKX2* en el brote axilar, mostrando menor y mayor cantidad de esta hormona, respectivamente. La mayor cantidad de  $GA_4$  en todos los tejidos de ambos mutantes podría ser debida a que al inicio del brote lateral la planta necesite unas cantidades mínimas para su desarrollo, ya que las giberelinas actúan como reguladores endógenos del crecimiento y por lo tanto están implicadas en diversos procesos del desarrollo de las plantas (Hedden y Phillip, 2000; Thomas *et al.*, 2005). Consecuentemente, las giberelinas probablemente tendrán doble papel en la ramificación lateral: represor sobre la formación del brote axilar, y por otro lado necesarias para el desarrollo del mismo.

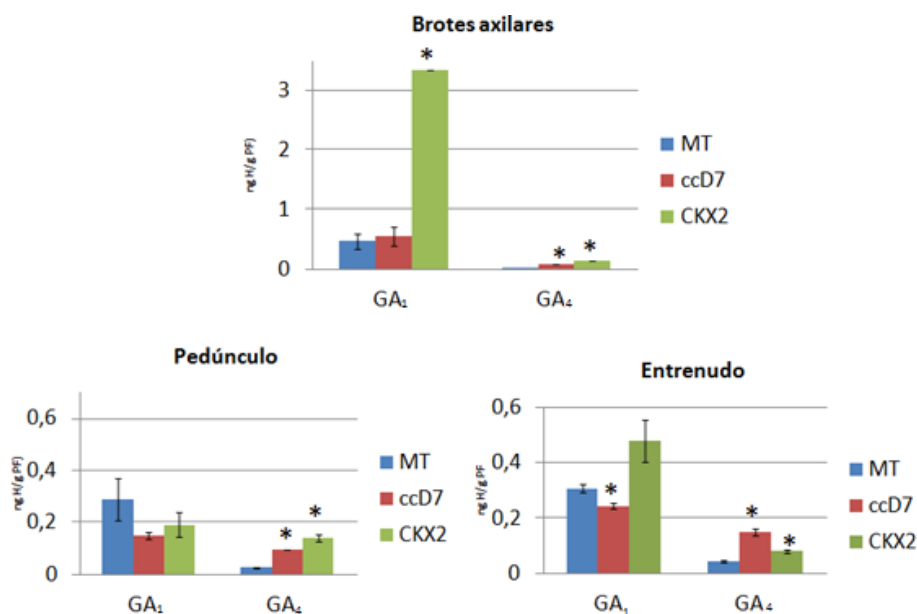


Figura 4.19. Cuantificación hormonal de las giberelinas activas ( $GA_1$  y  $GA_4$ ) de plantas de la variedad de tomate Micro-Tom y los mutantes hormonales con ramificación adelantada (*MT-35S::asccD7* (ccD7) y *MT-35S::CKX2* (CKX2)).

Los niveles hormonales entre los mutantes de ramificación adelantada y MT no muestran diferencias, con la excepción de los mayores niveles del orden de 100 veces más de ácido abscísico (ABA) y ácido salicílico (SA), presentada por el mutante MT-35S::CKX2 en comparación con la del otro mutante de ramificación adelantada y con MT (Tabla 4.2A).

El mutante MT-35S::CKX2 deficiente en citoquininas no debería de ramificar por la ausencia de estas, ya que son estimuladoras de la aparición de los brotes laterales según el modelo de ramificación lateral propuesto por Cheng *et al.* (2013). Sin embargo, este mutante hormonal sí presenta ramificación al igual que Vercruyssen *et al.* (2011) ha observado en sus estudios. Por otro lado, la ramificación adelantada del mutante deficiente en estrigolactonas podría ser debida a la ausencia de la hormona estrigolactona que actuaría reprimiendo la ramificación lateral, lo que es consistente con los resultados obtenidos por Cheng *et al.* (2013). En el caso del exceso de SA en el mutante MT-35S::CKX2 podría deberse al efecto sobre las plantas de algún tipo de estrés, ya que el papel principal de esta hormona es la defensa frente a estreses tanto abióticos como bióticos (Drazic y Mihailovic, 2005 y Chen *et al.*, 1993).

Tabla 4.2. Niveles hormonales en brote axilar, entrenudo y pedúnculo de los mutantes hormonales con ramificación adelantada (A) y similar (B) a Micro-Tom.

A

<b>MT</b>				
	<b>ABA</b>	<b>JA</b>	<b>SA</b>	<b>IAA</b>
<b>B.A</b>	32,5± 4,1	1,4±0,3	94,1±3,0	1,0±0,2
<b>P</b>	16,9±1,1	5,4±0,3	20,0±1,5	0,2±0,0
<b>E</b>	33,1±1,4	1,5±0,2	39,5±2,1	0,2±0,0

<b>MT- 35S::asccD7</b>				
	<b>ABA</b>	<b>JA</b>	<b>SA</b>	<b>IAA</b>
<b>B.A</b>	45,8±2,8	1,4±0,14	110,0±8,3	0,6±0
<b>P</b>	16,4±1,3	13,9±0,7	25,5±2,3	0,4±0,1
<b>E</b>	42,1±4,0	9,1±0,3	48,1±3,5	0,6±0,03

<b>MT- 35S::CKX2</b>				
	<b>ABA</b>	<b>JA</b>	<b>SA</b>	<b>IAA</b>
<b>B.A</b>	297,4±0,0	8,9±0,0	934,3±0	4,8±0,0
<b>P</b>	23,6±3,1	7,2±0,8	134,9±11,4	0,6±0,3
<b>E</b>	129,6±8,8	4,9±0,7	82,2±2,2	0,5±0,17



B

<i>sittiens</i>				
	ABA	JA	SA	IAA
B.A	11,2±0,0	1,6±0,0	143,7±0,0	0,29±0,0
P	7,9±0,5	1,8±0,1,0	56,5±3,8	0,2±0,04
E	18,88±2,8	1,7±0,1	158,8±7,7	0,4±0,07

#### 4.5.4 Cuantificación hormonal de mutantes con ramificación similar o ligeramente retrasada a Micro-Tom

La planta con ramificación similar a Micro-Tom se corresponde con el mutante deficiente en ácido abscísico, *sit*. En la Figura 4.20 podemos observar que en el caso de las giberelinas activas, el mutante *sit* contiene distintos niveles de GA<sub>4</sub> en los tres tejidos (doble cantidad en brote axilar y niveles del orden de la mitad en entrenudo y pedúnculo) y similares niveles de GA<sub>1</sub> que MT. A la vista de los resultados, la mayor cantidad de GA<sub>4</sub> en el brote axilar posiblemente estará produciendo la inhibición del mismo y cuando dicha cantidad sea reducida, entonces será cuando el brote podrá empezar a desarrollarse, por lo que el ligero retraso en la ramificación podría ser debido a la acción de la GA<sub>4</sub> en el inicio del brote axilar.

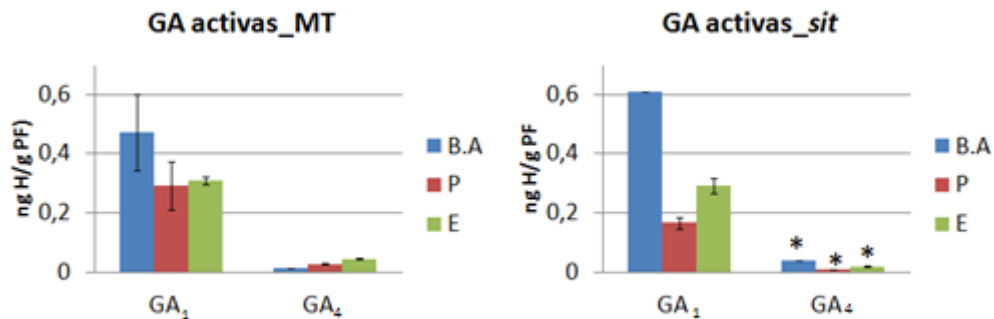


Figura 4.20. Cuantificación hormonal de las giberelinas activas (GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>) de plantas de la variedad de tomate Micro-Tom (MT) y el mutante deficiente en ácido abscísico (ABA), *sittiens* (*sit*), con ramificación similar pero ligeramente retrasada a MT.

En la tabla 4.2B podemos encontrar los niveles hormonales en brote axilar, entrenudo y pedúnculo del mutante *sit*, los cuales muestran que existe una disminución a la mitad de la concentración de ácido abscísico (ABA) en este mutante comparado con MT. El mutante *sit* es deficiente en ABA (Linthorpe *et al.*, 1987) lo que se correlaciona con estos datos. La cantidad de ácido salicílico es mayor en el mutante que en MT, lo cual podría ser debido a algún tipo de estrés sobre la planta, posiblemente de tipo abiótico como por ejemplo la sequía, ya que estas plantas al

tener menor cantidad de ABA son más sensibles y necesitan mayor cantidad de agua y humedad, como Perrone *et al.* (2012) han observado en sus estudios en plantas de vid, donde un aumento de la concentración de ABA en hojas de vid hacía que las plantas se recuperaran de la sequía.

El conjunto de resultados, muestra que el ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA) no se encuentran implicados en la aparición o inhibición de la ramificación lateral. La giberelina activa GA<sub>4</sub> posiblemente tendrá doble papel en la ramificación lateral, uno será su implicación en el inicio del desarrollo del brote axilar y el otro la inhibición en la ramificación lateral por el aumento de sus niveles. Las hormonas estrigolactonas y ácido abscísico tendrían un papel represor en el proceso de ramificación lateral. Estos resultados concuerdan con los resultados que otros autores (Rameau *et al.* (2015)) han propuesto, donde no solo las hormonas clásicas (auxinas, SLs y CKs) estarían implicadas en la ramificación lateral.

#### 4.6 CAPÍTULO VI. Rastreo y estudio del fenotipo de plantas doble mutante

Para observar el efecto producido en la ramificación mediante la posible interacción hormonal, se realizaron diferentes cruces entre los distintos mutantes hormonales. Las leyes de Mendel proporcionan datos teóricos de la distribución de los posibles fenotipos según el tipo de cruce realizado y la generación en la que se encuentre (Tabla 4.3). El número mínimo de plantas que se deben de plantar para comprobar que se cumpla la ley de Mendel de la segunda generación (F2) son 16 plantas de las semillas obtenidas en la primera generación (F1).

Basados en las leyes de Mendel, para la realización del estudio fenotípico de plantas dobles mutantes, se plantó un múltiplo de 16 plantas del cruce F1 (para obtener más de un doble mutante) y sus respectivos parentales (mutantes simples) como controles del fenotipo obtenido, para poder seleccionar e identificar los mutantes simples de los dobles mutantes.

Tabla 4.3.Segregación F2 teórica (Leyes de Mendel) según el tipo de cruce realizado.

Tipo de Cruce	Plantadas	Fenotipo WT	Fenotipo parental 1	Fenotipo parental 2	Fenotipo doble mutante
Recesivo x recesivo	16	9 (A_B_)	3 (aaB_)	3 (aaB_)	1 (aabb)

Dominante x recesivo	16	3 (aaB_)	9 (A_B_)	1 (aabb)	3 (aaB_)
Dominante x dominante	16	1 (aabb)	3 (aaB_)	3 (aaB_)	9 (A_B_)

4.6.1 Cruces entre mutantes hormonales con ausencia de ramificación (*procera* y *MT-35S::20ox1\_L19*) y del mutante no hormonal (*lateral suppressor*) con mutantes que sí ramifican

En la Tabla 4.4 podemos encontrar el número de plantas obtenidas de cada tipo de fenotipo en los cruces realizados frente al número de plantas esperadas teóricamente según Mendel, este valor se presenta entre paréntesis.

Tabla 4.4. Segregación de los cruces entre mutantes sin ramificación y con ramificación. (D=Mutación dominante; R=Mutación recesiva)

CRUCE	CRECIDAS	FENOTIPO WILD-TYPE	FENOTIPO PARENTAL 1	FENOTIPO PARENTAL 2	FENOTIPO DOBLE MUTANTE
<i>ent</i> x <i>pro</i> (R x R)	23	15 (13)	2 (4)	5 (4)	2 (1 ó 2)
<i>35S::20ox1_L19</i> x <i>ent</i> (D x R)	46	13 (8 ó 9)	26 (26)	3 (3)	4 (8 ó 9)
<i>35S::asccD7</i> x <i>pro</i> (D x R)	33	24 (6)	4 (18)	3 (2)	2 (6)
<i>35S::asccD7</i> x <i>ls</i> (D x R)	38	14 (7 u 8)	9 (21)	4 (2)	11 (7)
<i>ls</i> x <i>35S::nahG</i> (D x R)	40	15 (7 u 8)	16 (22)	4 (2)	5 (7)
<i>sit</i> x <i>ls</i> (R x R)	39	25 (22)	5 (7)	8 (7)	1 (2)
<i>35S::20ox1_L19</i> x <i>35S::nahG</i> (D x D)	40	10 (2)	_ (7 u 8)	_ (7 u 8)	9 (22)

➤ CRUCES DOMINANTE POR RECESIVO:

Los cruces realizados entre mutantes dominantes y recesivos han sido: *MT-35S::20ox1\_L19* por *entire*, *MT-35S::asccD7* por *procera*, *lateral suppressor* por *MT-35S::nahG* y *MT-35S::asccD7* por *lateral suppressor*.

Para el cruce **MT-35S::20ox1\_L19 por entire** se obtuvieron 4 plantas posibles dobles mutantes ya que se caracterizaban por tener hojas con un solo foliolo como el mutante simple *ent* y con mayor altura que Micro-Tom, ausencia de ramificación y algunas flores con ejerción estigmática como ocurre en el mutante simple *L19*. Tras el estudio de la descendencia F3 de cada una de estas plantas, se seleccionó la doble mutante (Figura 4.21). Estos resultados muestran que el fenotipo de ramificación nula del mutante *L19* es epistático al observado en el mutante *ent*, e hipostático con respecto al número de foliolos de la hoja.

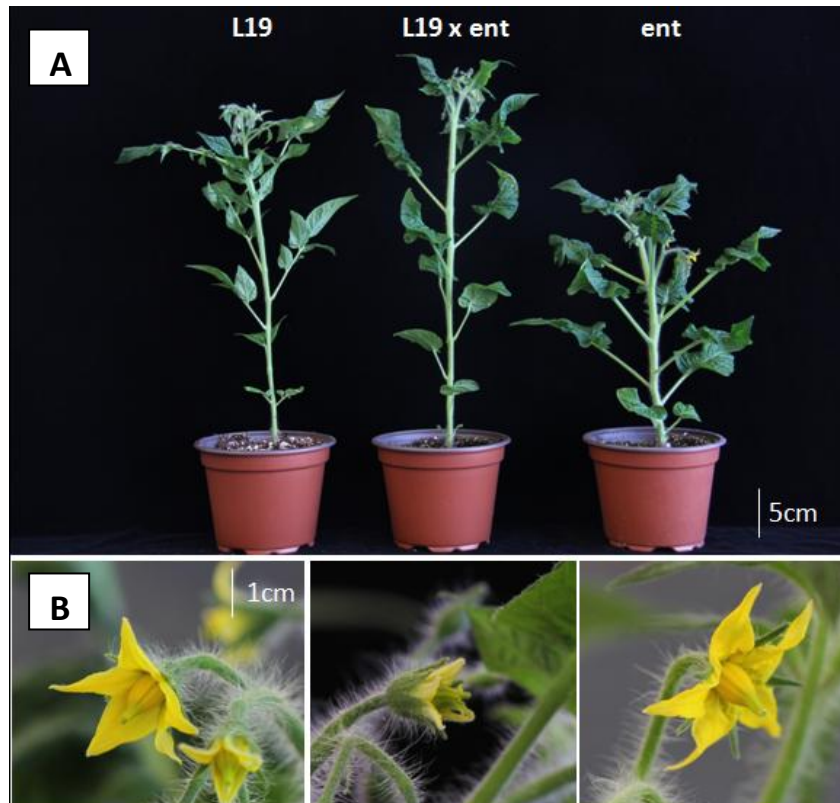


Figura 4.21. Cruce MT-35S::20ox1\_L19 por *entire*. A: Comparación del cruce con sus parentales. B: Inflorescencias del cruce y de sus parentales.

En el caso del cruce **35S::asccD7 por procera** se identificaron dos fenotipos posibles para el doble mutante. El fenotipo del posible doble mutante perteneciente al fenotipo I presentaba hojas con coloración más verdosa y rugosas que nos recuerda al mutante simple MT-35S::asccD7 y sus flores tienen ejerción estigmática y ausencia de ramificación como el mutante simple *pro*. Por otro lado, el fenotipo doble mutante correspondiente con el fenotipo II posee ramificación, aunque menor que la del mutante MT-35S::asccD7, mayor número de hojas que este parental y flores con ejerción del estigma como el mutante *pro*. Esto puede ser debido a que el mutante simple MT-35S::asccD7 es producido por una inserción de una construcción antisentido, cuya inserción completa causaría un fenotipo mientras que una pequeña inserción sería suficiente para causar una mutación y produciría otro fenotipo distinto.

Por esta razón, la proporción obtenida no se ajusta a la ley de Mendel. Se ha ido a la 3ª generación para ver la descendencia de estas plantas, y se comprueba que las semillas de la planta sin ramificación, correspondiente al fenotipo I, es realmente la doble mutante, ya que toda su descendencia presenta en el 100% de las plantas ausencia de ramificación y exorción estigmática (Figura 4.22), tiene retraso en la floración y la copa del mutante es como la del mutante simple *MT-35S::asccD7*, mucho más frondosa a la que se observa en *pro* (Figura 4.23). Estos resultados muestran que el fenotipo de ramificación nula del mutante *pro* es epistático al observado en el mutante *MT-35S::asccD7*, e hipostático con respecto al tipo de copa.

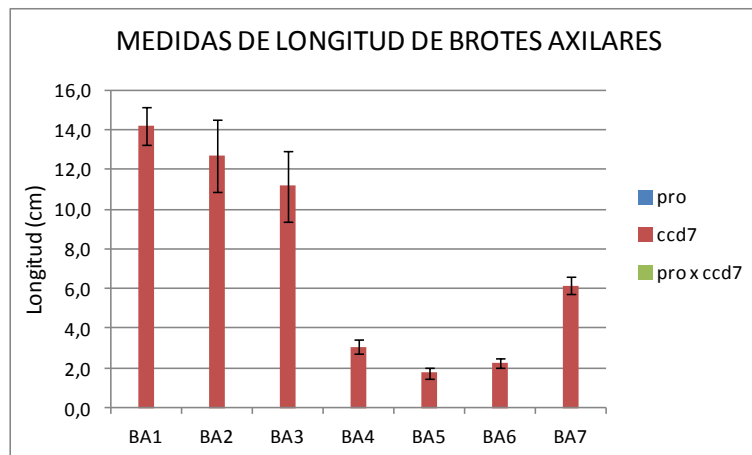


Figura 4.22. Medidas de longitud de los brotes axilares de cada hoja hasta la hoja anterior a la simpodial como media de 6 plantas de los homocigotos *MT-35S::asccD7* y *pro*, así como del doble mutante *MT-35S::asccD7* por *procera*.

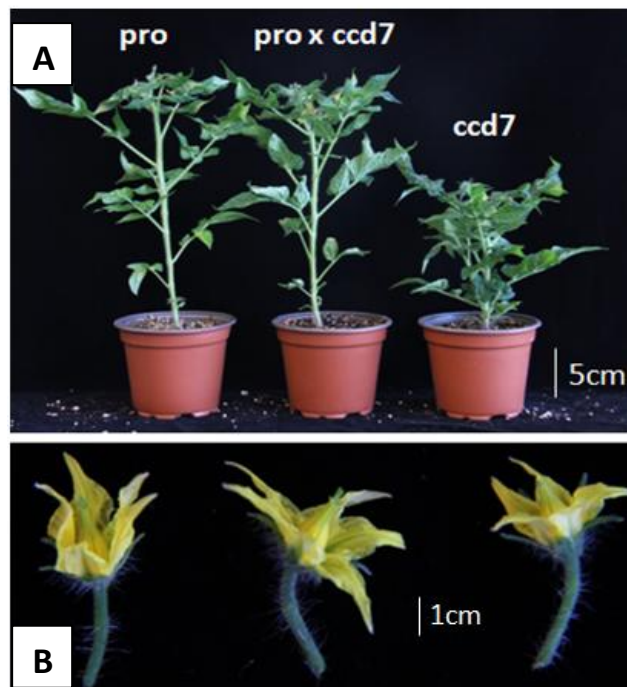


Figura 4.23. Cruce *MT-35S::asccD7* por *procera*. A: Comparación del cruce con sus parentales. B: Inflorescencias del cruce y de los parentales.

El cruce *lateral suppressor (ls)* por *MT-35S::nahG* se ajustó a la proporción esperada y se obtuvieron 4 plantas dobles mutantes (Figura 4.24). Estas plantas se caracterizaban por tener flores con ausencia de pétalos, formación de un ramillete en la copa donde se obtiene un número reducido de flores (4-6) y ausencia de ramificación como el mutante *ls*; además presentan necrosis en sus hojas como el mutante simple *MT-35S::nahG*. Estos resultados muestran que el fenotipo de ramificación nula del mutante *ls* es epistático al observado en el mutante *MT-35S::nahG*, e hipostático con respecto a la necrosis de las hojas.

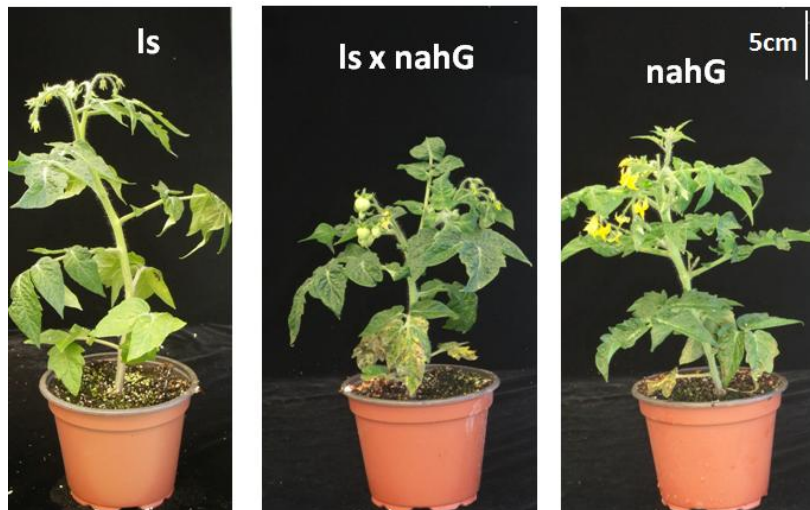


Figura 4.24. Cruce *ls* por *MT-35S::nahG* comparado con sus parentales.

Finalmente, en el cruce *MT-35S::asccD7* por *lateral suppressor (ls)* se han obtenido plantas doble mutantes, las cuales no ramifican (Figura 4.25) a excepción del brote axilar correspondiente a la posición de dos hojas antes de la hoja terminal (Figura 4.26). Éste brote nunca se desarrolla en las plantas *ls*, y en las plantas *MT-35S::asccD7*, sólo se observa de forma incipiente. Las flores presentan ausencia de pétalos como *ls* pero no posee 7 foliolos sino 5 foliolos como *MT-35S::asccD7*. Estos resultados muestran que el fenotipo de ramificación nula del mutante *ls* es epistático al observado en el mutante *35S::asccD7*, e hipostático con respecto al número de foliolos.

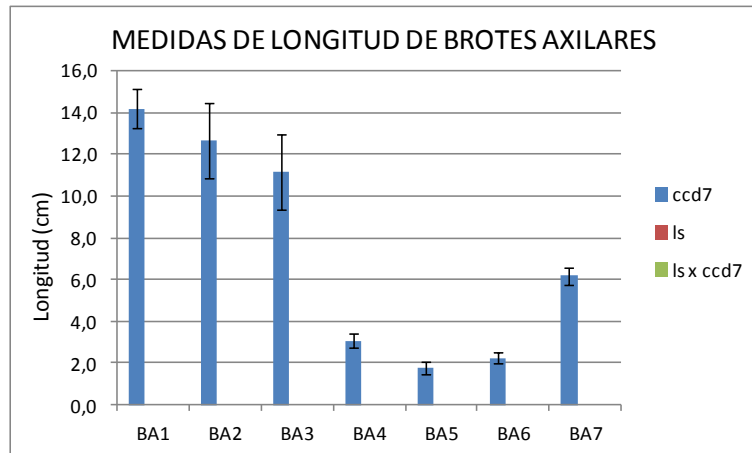


Figura 4.25. Medidas de longitud de los brotes axilares de cada hoja hasta la hoja anterior a la simpodial como media de 6 plantas de los homocigotos *MT-35S::asccD7* y *ls* y del doble mutante *MT-35S::asccD7* por *ls*.

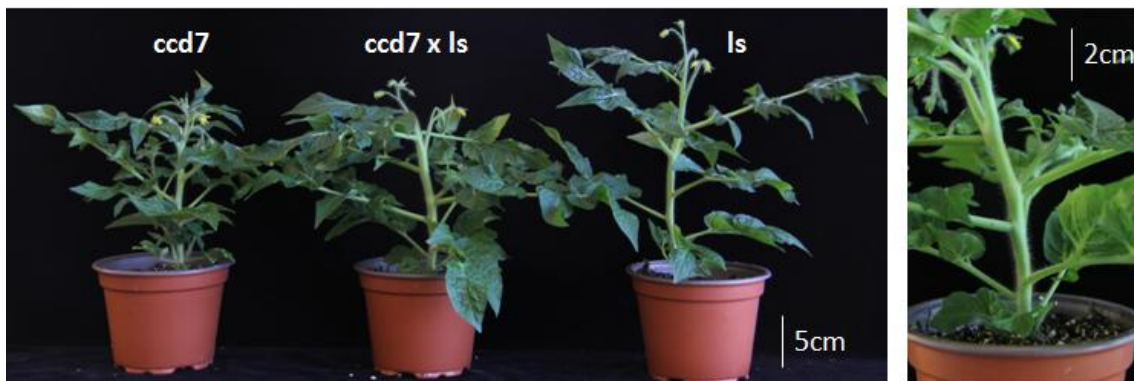


Figura 4.26. Cruce *MT-35S::asccD7* por *ls* comparado con sus parentales y ampliación del brote axilar correspondiente a dos hojas menos de la hoja simpodial de cruce.

➤ **CRUCE DOMINANTE POR DOMINANTE:**

Las plantas doble mutantes (9 plantas) del cruce *MT-35S::20ox1\_L19* por *MT-35S::nahG* mostraron ambas características del mutante *L19*, ausencia de ramificación y mayor altura, y la característica principal del otro parental, hojas necrosadas como se puede observar en la Figura 4.27. Estos resultados muestran que el fenotipo de ramificación nula del mutante *L19* es epistático al observado en el mutante *MT-35S::nahG*, e hipostático con respecto a la necrosis en las hojas.



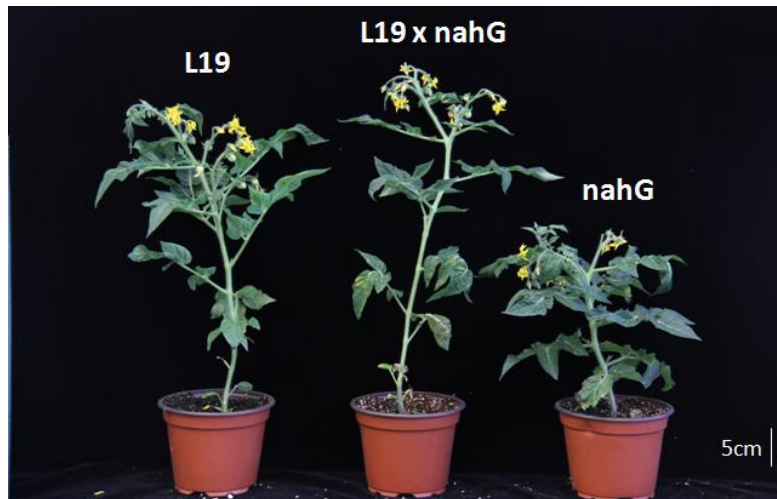


Figura 4.27. Cruce MT-35S::20ox1\_L19 por MT-35S::nahG comparado con sus parentales.

➤ **CRUCES RECESIVO POR RECESIVO:**

En este grupo podemos encontrar los siguientes cruces:

- El cruce **entire por procera** se encuentra dentro de la proporción esperada y 2 han sido las plantas que presentan hojas con un solo foliolo típicas del mutante simple *ent* y altura y flores con ejerción estigmática características del mutante *pro* (Figura 4.28). Estos posibles dobles mutantes presentan ausencia en la ramificación, tal y como ocurre en el mutante *pro*, donde los brotes laterales quedan latentes y no se desarrollan. Estos resultados muestran que el fenotipo de ramificación nula del mutante *pro* es epistático al observado en el mutante *ent*, e hipostático con respecto al número de foliolos.

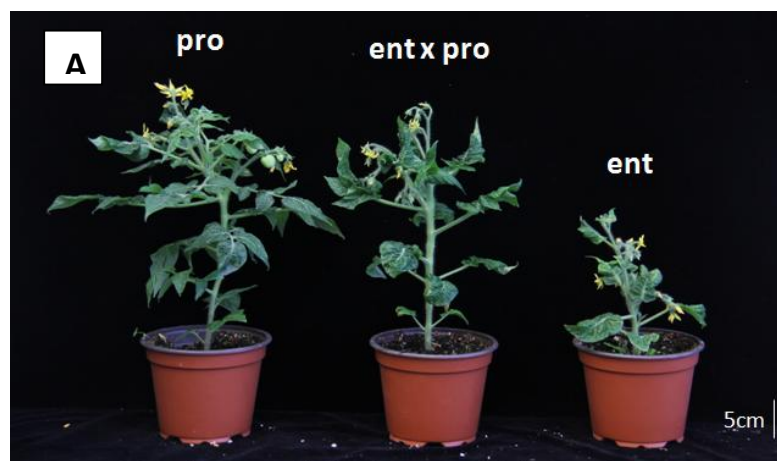






Figura 4.28. Cruce *entire* por *procera*. A: Comparación del cruce con sus parentales. B: Inflorescencias del cruce y de los parentales.

- El cruce *sittiens (sit)* por *lateral suppressor (ls)* se ajusta a la segregación teórica. De este cruce se obtuvo un doble mutante que como se muestra en la Figura 4.29 se caracteriza por poseer tamaño pequeño, arrugado y muestras de deshidratación como el parental *sit* y escasas flores y con ausencia de pétalos como el mutante *ls*, además de no mostrar ramificación. Estos resultados muestran que el fenotipo de ramificación nula del mutante *ls* es epistático al observado en el mutante *sit*, e hipostático con respecto a la deshidratación de la planta.

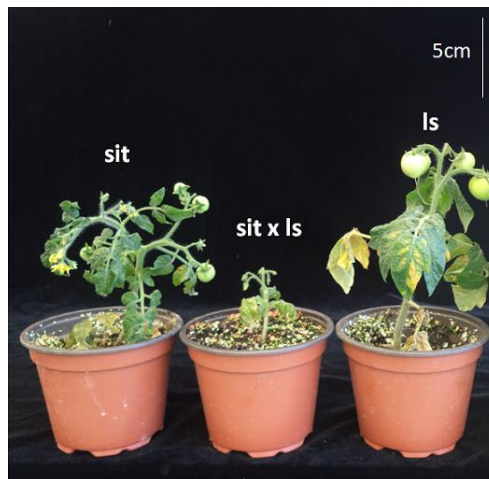


Figura 4.29. Cruce *sit* por *ls* comparado con sus parentales.

#### 4.6.2 Cruce entre el mutante con ramificación adelantada (*MT-35S::asccD7*) y el mutante *entire*, sin diferencias en el tiempo de ramificación

Uno de los mutantes simples que se caracteriza por tener la capacidad de ramificar con anterioridad a Micro-Tom es *MT-35S::asccD7*. Este mutante se cruzó con el mutante *ent* que no presenta diferencias en el tiempo de aparición de los brotes laterales. El objetivo de dicho cruce fue obtener y estudiar su doble mutante, y en particular conocer su patrón de ramificación. El cruce realizado y su segregación se presentan en la Tabla 4.5:

Tabla 4.5. Segregación del cruce con el mutante de ramificación adelantada. (D=Mutación dominante; R=Mutación recesiva).

CRUCE	CRECIDAS	FENOTIPO WILD-TYPE	FENOTIPO PARENTAL 1	FENOTIPO PARENTAL 2	FENOTIPO DOBLE MUTANTE
<b>35S::asccD7 x ent (D x R)</b>	42	35 wt o ccd7 (6)	35 wt o ccd7 (23)	5 (2 ó 3)	2 (8)

- **MT-35S::asccD7 por entire:** Se seleccionaron únicamente las plantas que poseían un solo foliolo, característica trivial del mutante simple *ent*, y de estas se identificaron 2 posibles dobles mutantes porque se parecían al mutante deficiente en estrigolactonas en la altura y en el tipo de ramificación (Figura 4.31). En la Figura 4.30 se puede ver que la ramificación del doble mutante es menor que la del mutante simple *MT-35S::asccD7* y mayor a la del otro parental, *ent*. Con respecto al patrón de ramificación es triangular como *MT-35S::asccD7* pero contrario a *ent*, cuyo patrón es triangular invertido. Estos resultados muestran que el fenotipo de patrón de ramificación del mutante *MT-35S::asccD7* es epistático al observado en el mutante *ent*, e hipostático con respecto al número de foliolos.

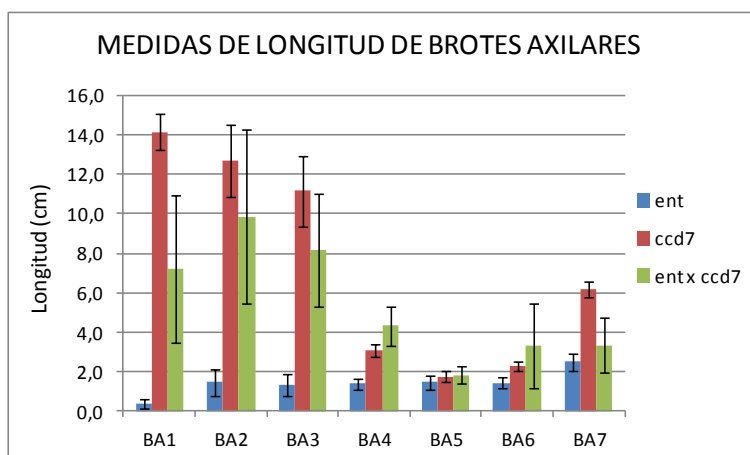


Tabla 4.30. Medidas de longitud de los brotes axilares de cada una de las hojas hasta la hoja anterior a la simpodial como media de 6 plantas en los homocigotos *MT-35S::asccD7* y *ent*, así como en el doble mutante *MT-35S::asccD7* por *ent*.

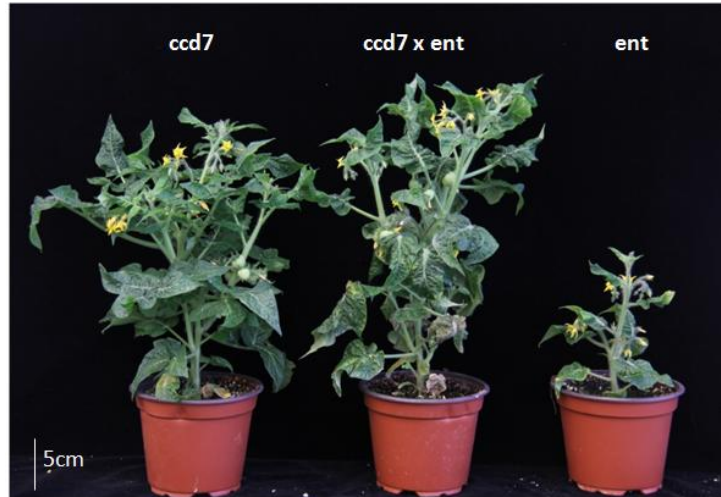


Figura 4.31. Cruce  $35S::asccD7$  por  $ent$  comparado con sus parentales.

#### 4.6.3 Cruces de los mutantes con ramificación adelantada ( $MT-35S::asccD7$ y $MT-35S::CKX2$ ) y las líneas deladoras $GUS$ ( $20ox1::GUS$ y $DR5::GUS$ )

- **$MT-35S::asccD7$  por  $DR5::GUS$ :** Se seleccionaron 2 plantas posibles doble mutantes ya que portaban las características de ambos parentales, poseían ramificación lateral como el mutante simple  $MT-35S::asccD7$  y producían expresión  $GUS$ . Estos resultados muestran que el fenotipo de expresión  $GUS$  del mutante  $DR5::GUS$  es epistático al observado en el mutante  $MT-35S::asccD7$ , e hipostático con respecto al tipo de ramificación lateral.
- **$MT-35S::asccD7$  por  $20ox1::GUS$ :** Este cruce no se ajusta a la proporción esperada, únicamente 4 plantas se identificaron como doble mutante. Estas plantas se seleccionaron en primer lugar porque tenían expresión  $GUS$  y posteriormente tenían la ramificación adelantada y con gran vigor, característica del parental  $MT-35S::asccD7$ . Estos resultados muestran que el fenotipo de expresión  $GUS$  del mutante  $20ox1::GUS$  es epistático al observado en el mutante  $MT-35S::asccD7$ , e hipostático con respecto al adelanto en la ramificación.
- **$MT-35S::CKX2$  por  $DR5::GUS$ :** Este cruce se ajusta a la segregación esperada y las plantas tienen fenotipo típico de  $MT-35S::CKX2$  (desarrollo y floración tardía de la planta, color de las hojas verde oscuro, mayor número de ramas y hojas pequeñas y delgadas) además de poseer expresión  $GUS$ . Estos resultados muestran que el fenotipo de expresión  $GUS$  del mutante  $DR5::GUS$  es epistático al observado en el mutante  $MT-35S::CKX2$ , e hipostático con respecto a la forma y tamaño de las hojas.

- **MT-35S::CKX2 por 20ox1::GUS:** Cumple la proporción esperada y las plantas dobles mutantes se caracterizan por tener expresión GUS y fenotipo similar al otro parental como son el desarrollo y floración tardía de la planta, color de las hojas verde oscuro, mayor número de ramas y hojas pequeñas y delgadas. Estos resultados muestran que el fenotipo de expresión GUS del mutante *20ox1::GUS* es epistático al observado en el mutante *MT-35S::CKX2*, e hipostático con respecto a la forma y tamaño de las hojas.

Tabla 4.6. Segregación de los cruces entre los mutantes de ramificación adelantada y las líneas deladoras GUS. (D=Mutación dominante; R=Mutación recesiva).

CRUCE	CRECIDAS	FENOTIPO WILD-TYPE	FENOTIPO PARENTAL 1	FENOTIPO PARENTAL 2	FENOTIPO DOBLE MUTANTE
<b>35S::asccD7 x 20ox1::GUS (D x D)</b>	48	24 wt o ccD7 (3)	24 wt o ccD7 (9)	18 (9)	4 (27)
<b>35S::asccD7 x DR5::GUS (D x D)</b>	48	34 wt o ccD7(3)	34 wt o ccD7 (9)	12 (9)	2 (27)
<b>35S::CKX2 x 20ox1::GUS (D x D)</b>	40	3 (2)	11 (7)	7 (7)	19 (23)
<b>35S::CKX2 x DR5::GUS (D x D)</b>	48	6 (3)	8 (9)	11 (9)	23 (27)

#### 4.7 CAPÍTULO VII. Análisis de expresión del gen BRANCHED (BRC) en yemas axilares

En *Arabidopsis* el gen *BRANCHED1 (BRC1)*, que codifica un factor bHLH, se ha relacionado con la ruta de señalización de las estrigolactonas (SLs). La expresión del gen *BRC1* está reprimida en las yemas axilares de los mutantes *max (more axillary growth)*, y es inducida por la aplicación exógena de SLs (Aguilar-Martínez, *et al.*, 2007; Mashiguchi, *et al.*, 2009). En el laboratorio de Pilar Cubas (Centro Nacional de Biotecnología, CNB – Madrid) han aislado el ortólogo de tomate del gen *BRANCHED1* de *Arabidopsis*. El silenciamiento de este gen causa el fenotipo ramificado (por el desarrollo de las yemas axilares) típico de los mutantes *BRC1* o *max* de *arabidopsis*, involucrados con la señalización de las estrigolactonas.

Las yemas axilares de las líneas de sobre-expresión de la 20 oxidasa (*L19*) y *procera* (*pro*) no se desarrollan, por lo que es de interés conocer si la ausencia de ramificación está asociada a una mayor expresión del gen BRANCHED (BRC). Por otro lado, la expresión del gene BRC en yemas axilares de plantas WT tratadas con giberelinas (GAs) o paclobutazol (PCB), puede indicar si dicho gen se encuentra regulado por GAs.

Para detectar la presencia del gen implicado en la formación de los brotes axilares en plantas, usamos la técnica de PCR con 3 parejas de cebadores (SIBRC1A\_587U23 y SIBRC1A\_664L24, SIBRC1A.1\_908U29 y SIBRC1A.1\_987L24, SIBRC1B\_154U26 y SIBRC1B\_232L22) de acuerdo a las condiciones descritas en el capítulo de Materiales y Métodos apartado 3.10. Como controles empleamos el DNA de la planta Micro-Tom y de la planta Mock.

En la Figura 4.22 se puede observar que los niveles de transcrito varían entre las diferentes isoformas y también entre las diferentes líneas o tratamientos realizados. Los niveles de los mensajeros 1A y 1A-1 no presentan diferencias entre la línea control y líneas *L19* o *pro*, mientras que los niveles del mensajero 1B son mayores en estas líneas, con respecto a la control. Por otro lado, los niveles del mensajero 1A no presenta diferencias entre la muestra mock y las muestras tratadas con GAs o PCB, mientras que los niveles del mensajero 1A-1 y especialmente el 1B son mayores en el tratamiento con GAs y se reducen en el tratamiento con PCB. Estos resultados parecen apuntar que las isoformas del gen BRANCHED 1A-1 o 1B estarían implicadas en la ramificación lateral. Estudios realizados por Martín-Trillo *et al.* (2011) indicarían que posiblemente el gen implicado sería el 1B, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente memoria.

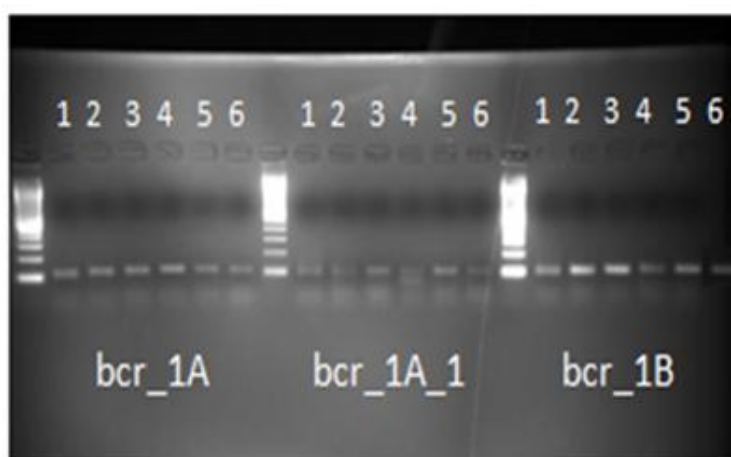


Figura 4.22. Amplificación del fragmento correspondiente al gen BCR1 a partir del DNA de brotes axilares. Carril 1: Micro-Tom (control), Carril 2: Mutante *L19*, Carril 3: Mutante *pro*, Carril 4: Plantas tratadas Mock, Carril 5: Plantas tratadas con +GA<sub>3</sub>, Carril 6: Plantas tratadas con PCB.

## 5. CONCLUSIONES

- Las hormonas estrigolactonas (SLs) y citoquininas (CKs), pueden participar en el fenotipo de ramificación de la variedad MT de tomate, ya que el patrón de ramificación de tipo triangular invertido de la variedad MT, se altera en los mutantes hormonales de estas hormonas a triangular. El fenotipo de ramificación no se modifica en los mutantes hormonales de ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA) y auxinas (IAA), lo que indica que estas hormonas no alterarían dicho patrón.
- La ausencia de ramificación en los mutantes *MT-35S::20ox1\_L19*, *procera* y *lateral suppressor* es epistático a lo observado en los mutantes *entire*, *MT-35S::nahG*, *MT-35S::asccD7* y *sittiens*, en cada uno de los respectivos cruces. Además, el patrón de ramificación del mutante *MT-35S::asccD7* es epistático al estudiado en el mutante *entire*.
- La ramificación no se altera en los mutantes hormonales de ácido jasmónico o ácido salicílico, indicando que estas hormonas no se encuentran implicados directamente en la aparición o inhibición de la ramificación lateral.
- La caracterización de los dobles mutantes obtenidos ha permitido caracterizar otros caracteres fenotípicos de interés. Con respecto al **número de foliolos** de la hoja, los mutantes *MT-35S::asccD7*, *MT-35S::20ox1\_L19* y *procera* son hipostáticos a lo observado en el mutante *entire*, al igual que ocurre entre *lateral suppressor* y *MT-35S::asccD7*. Además, los mutantes *MT-35S::20ox1\_L19* y *lateral suppressor* son hipostáticos a lo estudiado en el mutante *MT-35S::nahG*, con respecto a la **necrosis de las hojas**. En relación al **tipo de copa** y la **deshidratación en la planta**, el mutante *lateral suppressor* es hipostático al mutante *sittiens*, y *procera* al mutante *MT-35S::asccD7*, respectivamente.
- Las cuantificaciones hormonales realizadas, indican que las giberelinas (GAs), estrigolactonas (SLs) y ácido abscísico (ABA) podrían estar implicadas en la inhibición de la aparición y desarrollo de los brotes axilares, y por tanto estarían implicadas en el proceso de ramificación lateral. La giberelina activa GA<sub>4</sub> tendrá doble papel en la ramificación lateral, implicación en el inicio del desarrollo del brote axilar e inhibición en la ramificación lateral por el aumento de sus niveles.
- La auxina (IAA) permanece acumulada en el inicio del brote y por tanto, el IAA podría estar controlando el movimiento desde la raíz hacia arriba de una señal

o segundo mensajero que pudiera estar introduciéndose dentro del brote axilar y regulando su desarrollo. Sin embargo, las GAs se encuentran distribuidas dentro de toda el área del tallo y en el brote axilar en el momento anterior a la ramificación, ya que esta señal va perdiendo su intensidad una vez la planta ha ramificado, pudiendo estar actuando inhibiendo la ramificación lateral. Por otro lado, la posible interacción entre las giberelinas y las auxinas está aún por determinar.

- En cuanto a la expresión del gen BRANCHED, los niveles de expresión de la isoforma 1B fueron mayores en las líneas MT-35S::20ox1\_L19 y *procera*. Además, los niveles tanto del mensajero 1A-1 como del 1B fueron mayores en el tratamiento con ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y se redujeron en el tratamiento con paclobutrazol (PCB). Consecuentemente, las isoformas del gen BRANCHED 1A-1 o 1B estarían implicadas en la ramificación lateral.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- **Acosta-Echeverría, M, Sánchez-Bravo, J y Bañón-Arno, M.** (2000). Auxinas. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España, pp: 305-323.
- **Aguilar-Martínez, J.A, Poza-Carrión, C, Cubas, P.** (2007). *Arabidopsis* BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *Plant Cell*. 19: 458–472.
- **Atherton, J. G, Harris, G. P.** (1986). Flowering. En: *The Tomato Crop* (Eds. Atherton, J. G. y Rudich, J.) pp. 167-200. Chapman & Hall, New York/London.
- **Audenaert, K, De Meyer, G.B y Höfte, M.M.** (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiol*. 128: 491-501.
- **Bergougnoux, V.** (2013) The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnol Adv*. ISSN 0734-9750.
- **Bouwmeester, H.J, Roux, C, Lopez-Raez, J.A y Becard, G.** (2007). Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science*. 12: 224-230.
- **Brading, P.A, Hammond-Kosack, K.E, Parr, A y Jones, J.D.G.** (2000). Salicylic acid is not required for Cf-2- and Cf-9-dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant J*. 23: 305-318.
- **Branch, C, Hwang, C.F, Navarre, D.A y Williamson, V.M.** (2004). Salicylic acid is part of the mediated defense response to root-knot nematode in tomato. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 17: 351-356.
- **Brian, P.W, Elson, G.W, Hemming, H.G, Radley, M.** (1954). The plant growth promoting properties of gibberellic acid, a metabolic product of the fungus, *Gibberella fujikuroi*. *J. Sci. Food Agric*. 5:602–612.
- **Buchanan, B.B, Grissem, W y Jones, R.L.** (2000). Biochemical and molecular biology of plants. *Waldorf: American Society of Plant Physiologists*, pp. 884-894.
- **Carrera, E, Ruiz-Rivero, O, Peres, L. E. P, Atarés, A, J. L. García-Martínez** (2012) Characterization of the *procera* Tomato Mutant Shows Novel Functions of the SIDEELLA Protein in the Control of Flower Morphology, Cell Division and Expansion, and the Auxin-Signaling Pathway during Fruit-Set and Development. *Plant Physiol*. 160: 1581-1596.
- **Carvalho, R. F, Campos, M. L, Pino, L. E, Crestana, S. L, Zsögön, A, Lima, J. E, Benedito, V. A, Peres, L. E. P.** (2011) Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*. 7:18-31.



- **Chebotar, G.O y Chebotar, S.V.** (2011). Gibberellin-signaling pathways in plants. *Cytology and Genetics*. 45: 259-268.
- **Chen, X, Zhou, X, Xi, L, Li, J, Zhao, R, Ma, N, Zhao, L.** (2013) Roles of DgBRC1 in regulation of lateral branching in *Chrysanthemum* (*Dendranthema x grandiflora* cv. Jinba). *PLoS ONE*. 8(4): 61717-61727.
- **Chen, Z, Silva, H y Klessing, D.F.** (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*. 262: 1883-1886.
- **Cheng, X, Ruyter-Spira, C, Bouwmeester H.** (2013) The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development. *Frontiers in Plant Science*. 4 (199): 1-16.
- **Cheong, J.J y Choi, Y.D.** (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics*. 19: 409-413.
- **Chevalier, F, Nieminen, K, Sánchez-Ferrero, J.C, Rodríguez, M.L, Chagoyen, M, Hardtke, C.S y Cubas, P.** (2014). Strigolactone Promotes Degradation of DWARF14, an a/b Hydrolase Essential for Strigolactone Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 26: 1134-1150.
- **Chi, G.L, Goh, H.K.L, Hoo, K.Y, Legavre, T, Drew, R.A.** (1998). Gus gene expression in *Anthurium andreaeanum*, *Onbidium Gower Ramsey* and *Brassolaeliocattleya Orange Glory Empress* after particle bombardment. *Acta Horticulturae*. 461: 379-383.
- **De Saint Germain, A, Ligerot, Y, Dun, E.A, Pillot, J.P, Ross, J.J, Beveridge, C.A, et al.** (2013b). Strigolactones stimulate internode elongation independently of gibberellins. *Plant Physiol*. 163: 1012–1025.
- **Dengler, N.G.** (1984). Comparison of leaf development in normal (+/+), entire (e/e) and lanceolated (La/+) plants of tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Botanical Gazette*. 145: 66-77.
- **Dun, E.A, de Saint Germain, A, Rameau, C, Beveridge, C.A.** (2012). Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiol*. 158: 487–498.
- **García-Hurtado, N, Carrera, E, Ruiz-Rivero, O, López-Gresa, M. P, Hedden, P, Gong, F, García-Martínez J. L.** (2012) The characterization of transgenic tomato overexpressing *gibberellin 20-oxidase* reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration of the gibberellin biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* 63 (16): 5803-5813.
- **Gómez-Roldán, V, Fermas, S, Brewer, P.B, Puech-Pages, V, Dun, E.A, Pillot, J.P, Letisse, F, Matusova, R, Danoun, S, Portais, J.C, Bouwmeester, H, Becard, G, Beveridge, C.A, Rameau, C, Rochange, S.F.** (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*. 455: 189-194.
- **Gonzalez-Grandio, E, Poza-Carrion, C, Sorzano, C.O, y Cubas, P.** (2013). BRANCHED1 promotes axillary bud dormancy in response to shade in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25: 834–850.

- **Harberd, N.P.** (2003). Relieving DELLA restraint. *Science*. 299: 1853-1854.
- **Hare, P.D, Seo, H.S, Yang, J.Y y Chua, N.H.** (2003). Modulation of sensitivity and selectivity in plant signaling by proteasomal destabilization. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 453-462.
- **Hedden, P y Phillips, A.L.** (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*. 5: 523-530.
- **Hedden, P, Thomas, S.G.** (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* 444: 11-25.
- **Hull, A.K, Vij, R, y Celenza, J.L.** (2000). Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 2379-2384.
- **Ivanchenko, M.G, Coffeen, W.C, Lomax, T.L y Dubrovsky, J.G.** (2006). Mutations in the Diageotropica (Dgt) gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. *Plant J.* 46: 436-447.
- **Koltai, H, Lekkala, S.P, Bhattacharya, C, Mayzlish-Gati, E, Resnick, N, Winger, S, Dor, E, Yoneyama, K, Hershenhorn, J, Joel, D.M, Kapulnik, Y.** (2010). Tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. *Journal of Experimental Botany*. 61: 1739-1749.
- **Koornneef, M. y Van der Veen, J.H.** (1980). Induction and analysis of gibberellin-sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.). Heynh. *Theor Appl Genet.* 58:257-263.
- **Leyser, O y Day, S.** (2003). Shoot branching. In *Mechanisms in Plant Development* (Eds. Leyser, O. and Day, S.). Oxford: Blackwell Science, pp. 213–219.
- **Li, L, Zhao, Y, McCaig, B.C, Wingerd, B.A, Wang, J, Whalon, M.E, Pichersky, E, Howe, G.A.** (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for maternal control of seed maturation, jasmonate-signaling defense response, and glandular trichome development. *Plant Cell*. 16: 126-143.
- **Linforth, R, Bowman, W, Griffin, D, Marples, B, Taylor, I.** (1987). 2-trans-ABA alcohol accumulation in the wilty tomato mutants *flacca* and *sitiens*. *Plant Cell Environ.* 10: 599–606.
- **Lo, S.F, Yang, S.Y, Chen, K.T, Hsing, Y.I, Zeevaart, J.A, Chen, L.J, et al.** (2008). A novel class of gibberellins 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. *Plant Cell*. 20: 2603–2618.
- **Lombardi-Crestana, S, Azevedo, M.S, Silva, G.F.F, Pino, L.E, Appezzato-da-Glória, B, Figueira, A, Nogueira, F.T.S, Peres, L.E.P.** (2012). The tomato (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom) natural genetic variation *Rg1* and the DELLA mutant *procera* control the competence necessary to form adventitious roots and shoots. *Journal of Experimental Botany*. 63: 5689-5703.

- **Martí, E, Gisbert, C, Bishop, G. J, Dixon, M. S, García-Martínez J.L.** (2006) Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *J. Exp Bot.* 57 (9): 2037–2047.
- **Martín, J.A.** (2013). Estudio del papel del ácido abscísico como señal reguladora del proceso de Micorrización. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada-CSIC.
- **Martín-Trillo, M, González-Grandío, E, Serra, F, Marcel, F, Rodríguez-Buey, M.L, Schmitz, G, Theres, K, Bendahmane, A, Dopazo, H y Cubas, P.** (2011). Role of tomato BRANCHED1-like genes in the control of shoot branching. *The Plant Journal.* 67: 701-714.
- **Martínez, L.** (2014). Estudio del papel de los enzimas de catabolismo GA<sub>2</sub> oxidasas en el desarrollo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis Doctoral. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.
- **Mashiguchi, K, Sasaki, E, Shimada, Y, Nagae, M, Ueno, K, Nakano, T, Yoneyama, K, Suzuki, Y, Asami, T.** (2009). Feedback-regulation of strigolactone biosynthetic genes and strigolactone-regulated genes in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73: 2460–2465.
- **McCarty, D.R.** (1995). Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Molecular Biology.* 46: 71-93.
- **M Seo, M, Jikumaru, Y y Kamiya, Y.** (2011). Profiling of hormones and related metabolites in seed dormancy and germination studies. *Methods in Molecular Biology.* 773: 99-111.
- **Murashige, T, Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–479.
- **Murfet, I.C y Reid, J.B.** (1993). “Developmental mutants,” in *Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*, eds R. Casey and D.R.Davies (Wallingford: CAB), 165–216.
- **Naleway, J.J.** (1992). In *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gen Expression*. S. R. Gallagher. (Ed. Academic Press Inc. San Diego, California, USA). Histochemical, spectrophotometric, and fluorometric GUS substrate, pp. 61-76.
- **Oh, K, Ivanchenko, M.G, White, T.J y Lomax, T.L.** (2006). The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. *Planta.* 224: 133-144.
- **Paszkowski, U.** (2006). A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist.* 172: 35-46.
- **Perrone, I, Pagliarani, C, Lovisolo, C, Chitarra, W, Roman, F, Schubert, A.** (2012). Recovery from water stress affects grape leaf petiole transcriptome. *Planta.* 235: 1383–1396.

- **Phinney, B.O.** (1956). Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 42: 185–189.
- **Pino, L.E, Lombardi-Crestana, S, Azevedo, M.S, Farinha, T.B, Borgo, L, Quecini, V, Figueira, A, Peres, L.E.P.** (2010). The *Rg1* allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato Micro-Tom model system. *Plant Methods.* 6: 23.
- **Poveda, J.** (2013). Papel del ácido salicílico en la interacción entre el hongo beneficioso *Trichoderma harzianum* y la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Trabajo fin de grado. Departamento de Fisiología Vegetal. Universidad de Salamanca.
- **Pysh, L.D, Wysocka-Diller, J.W, Camilleri, C, Bouchez, D y Benfey, P.N.** (1999). The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant J.* 18: 111-119.
- **Rameau, C, Bertheloot, J, Leduc, N, Andrieu, B, Foucher, F, Sakr, S.** (2015). Multiple pathways regulate shoot branching. *Frontiers in Plant Science.* 5 (741): 1-15.
- **Ranjan, A, Ichihashi, Y, Sinha N. R.** (2012) The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. *Genome Biology.* 13:167-174.
- **Rao, M.V y Davis, K.R.** (2001). The physiology of ozone induced cell death. *Planta.* 213: 682-690.
- **Robert, H y Friml, J.** (2009). Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology.* 5: 325-332.
- **Sambrook, Fritsch y Maniatis.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, New York.
- **Schmitz, G, Theres, K.** (1999) Genetic control of branching in *Arabidopsis* and tomato. *Curr Opin Plant Biol.* 2(1):51-55.
- **Scott, J.W, Harbaugh, B. K.** (1989) Micro-Tom: a miniature dwarf tomato. *Florida Agr Exp Sta Cir.* 370:1-6.
- **Segura, J.** (2000). Citoquininas. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España, pp: 343-360.
- **Seki, M, Umezawa, T, Urano, K y Shinozaki, K.** (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress response. *Current Opinion in Plant Biology.* 10: 296-302.
- **Silverstone, A.L, Mak, P.Y, Martinez, E.C, y Sun, T.P.** (1997). The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellins response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* 146: 1087–1099.
- **Schumacher, K, Ganal, M y Theres, K.** (1995). Genetic and physical mapping of the *lateral suppressor (ls)* locus in tomato. *Molecular Genetics y Genomics.* 246: 761-766.
- **Schumacher, K, Schmitt, T, Rossberg, M, Schmitz, G y Theres, K.** (1999). The *Lateral suppressor (ls)* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *PNAS USA.* 96: 290-295.

- **Takei, K, Yamaya, T y Sakakibara, H.** (2004). Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin. *J. Biol. Chem.* 40: 41866-72.
- **Tal, M.** (1979). Abnormal stomatal behavior and hormonal imbalance in flacca, a wilted mutant of tomato: V. effect of abscisic acid on indoleacetic acid metabolism and ethylene evolution. *Plant physiology.* 63: 1044-1048.
- **Talón, M.** (2000). Giberelinas. In: Azcón-Bieto J, Talón M, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España, pp: 325-341.
- **Tanaka, M, Takei, K, Kojima, M, Sakakibara, H, y Mori, H.** (2006). Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J.* 45: 1028–1036.
- **Thara, V.K, Tang, X, Gu, Y.Q, Martin, G.B y Zhou, J.M.** (1999). *Pseudomonas syringae* pv tomato induces the expression of tomato *EREBP-like* genes *Pti4* and *Pti5* independent of ethylene, salicylate and jasmonate. *Plant J.* 20: 475-483.
- **Thomas SG, Hedden P.** (2006) Gibberellin metabolism and signal transduction. In Plant Hormone Signaling. (Eds. P Hedden, SG Thomas). Oxford: Blackwell Science, pp 147–184.
- **Thomas, S.G, Rieu, I, Steber, C.M.** (2005) Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam Horm.* 72:289-338.
- **Ton, J, Van Pelt, J.A, Van Loon, L.C y Pieterse, C.M.J.** (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 15:27-34.
- **Tong, H, Jin, Y, Liu, W, Li, F, Fang, J, Yin, Y, et al.** (2009). DWARF AND LOW-TILLERING, a new member of the GRAS family, plays positive roles in brassinosteroid signaling in rice. *Plant J.* 58: 803–816.
- **Tucker, D.J.** (1976). *New Phytol.* 77: 561–568.
- **Umehara, M, Handa, A, Yoshida, S, Akiyama, K, Arite, T, Takeda-Kamiya, N, Magome, H, Kamiya, Y, Shirasu, K, Yoneyama, K, Kyojuka, J, Ymaguchi, S.** (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature.* 455: 195-200.
- **Vercruyssen, L, Gonzalez, N, Wemer, T, Schmülling, T, Inzé, D.** (2011). Combining enhanced root and shoot growth reveals cross talk between pathways that control plant organ size in *Arabidopsis*. *Plant Physio.* 155: 1339-1352.
- **Vick, B.A, Zimmerman, D.C.** (1984). Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.* 75: 458–461.
- **Vogel, J.T, Walter, M.H, Giavalisco, P, Lytovchenko, A, Kohlen, W, Carnikhova, T, Simkin, A.J, Goulte, C, Strack, D, Bouwmeester, H.J, Fernie, A.R, Klee, H.J.** (2010). *SICCD7* controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato. *Plant J.* 61: 300-311.

- **Werner, T, Motyka, V, Laucou, V, Smets, R, Van Onckelen, H, Schmülling, T.** (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell*. 15: 2532-2550.
- **Yamaguchi, S, Kamiya, Y.** (2000) Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol*. 41(3):251-257.
- **Yamaguchi, S.** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*. 59: 225-251.
- **Yan, Z, Reddy, M.S, Ryu, C.M, McInroy, J.A, Wilson, M y Kloepper, J.W.** (2002). Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. 92: 1329-1333.
- **Zacarías, L y Lafuente, M.T.** (2000). Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo. In: Azcón-Bieto J, Talón M. eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Barcelona, España, pp: 361-376.
- **Zhang, J, Chen, R, Xiao, J, Qian, C, Wang, T, Li, H, Ouyang, B y Ye, Z.** (2007). A single-base deletion mutation in SlIAA9 gene causes tomato (*Solanum lycopersicum*) entire mutant. *J. Plant Res*. 120: 671-678.
- **Zhang, J, Jia, W, Yang, J e Ismail, A.M.** (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*. 97: 111-119.