

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología



***“Estudio del papel de los enzimas de catabolismo
GA 2-oxidasas en el desarrollo de tomate (*Solanum
lycopersicum L.*)”***

Memoria de tesis doctoral presentada por:

Liliam Martínez Bello

Directora:

Dra Isabel Lopez Díaz

Tutor:

Dr Alejandro Atarés Huerta

Valencia 2014

Dra Isabel López Díaz, Doctora en Ciencias Biológicas, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y el **Dr Alejandro Atarés Huerta**, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biotecnología, adscrito al instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia.

CERTIFICAN que la Licenciada en Microbiología **Liliam Martínez Bello**, ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas el trabajo que lleva por título “*Estudio del papel de los enzimas de catabolismo GA 2-oxidasas en el desarrollo de tomate (Solanum lycopersicum L.)*”, y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor en Biotecnología.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Valencia, a 06 de Marzo de 2014

Dra Isabel López Díaz

Dr Alejandro Atarés Huerta

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca JAE-Predoc del programa Junta para la Ampliación de Estudios del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y bueno ahora lo último en escribirse en esta tesis pero lo más emotivo. Empezando por el principio, todo empezó una tarde en La Habana en un concierto (no consigo acordarme muy bien de quién). Me encontré con una amiga y nos pusimos a contarnos como nos habían ido las cosas. Mi amiga estaba en España haciendo el doctorado en Barcelona y estaba muy feliz. Entonces me preguntó que si estaría interesada y yo le dije que sí con muchas ganas pero sin mucha fé porque sinceramente en ese tiempo no podía llegar a imaginarme que fuera siquiera posible. Nos intercambiamos los correos y quedamos en que si se enteraba de algo me mandaría la oferta para que yo aplicara. Y así fue, un día abrí el correo y ahí estaba. Era una oferta para trabajar en el control del desarrollo partenocárpico de tomate haciendo silenciamiento génico. Desde la universidad siempre había querido trabajar en eso así que escribí y a partir de ahí comenzó la carrera (literalmente). Busca el papel tal o más cual, hazte mil colas y toda una historia que duró nueve meses hasta que por fin desembarqué en España con una maleta y acompañada de dos grandes amigos. Y pasó el tiempo y pasó y cuatro años y medio aquí estamos. Ha sido una travesía larga que empezó desde antes de llegar a España y en la que han intervenido (por suerte para bien) muchísimas personas y a las que estoy y estaré muy agradecida. La verdad es que en un principio pensé poner solamente un “Gracias a todos” pero no sería justo resumir años con solo una frase así que aquí vamos y espero que no se me quede nadie.

Primero, primerísimamente a mis padres y mi abuela Gloria por todo. Por la fuerza, el apoyo, los chistes, los consejos, por hacerme las colas, por las madrugadas, por hacerme las maletas y en fin por apoyarme para lograr mis sueños.

A quienes considero mi segunda familia Manolo, Susana, Lorenzo, Álvaro, Marisa, Mai y Conxa por su enorme ayuda. Gracias a ellos sentí que al llegar a España llegaba a un hogar y no a un país extranjero y les debo una gran parte de este doctorado.

A Ana y Antonio por su amistad desde el primer día.

A mis amigos de siempre Katia, Maité, Reinier y Ernesto quienes entre risas y alegrías me apoyaron siempre incondicionalmente. A la “culpable” de todo, Patricia no solo por enviarme la oferta sino por todo su apoyo y sus consejos.

A Esperanza y Liliana por todo su apoyo emocional y espiritual, por sus palabras de aliento y sobre todo por confiar tanto en mí. A Manuel Mansur y Antonieta Herrera, a quienes en parte debo mi pasión por la ciencia y quienes siempre estuvieron prestos a aconsejarme y guiarme.

A Carmen María por sus acertados consejos y su positivismo.

A mi directora de tesis Isabel por su paciencia inagotable y su guía. A mis compañeros de trabajo Miriam, Esther, Ana, Omar y Teresa por todos sus consejos y su ayuda ya que sin ellos no creo que esto hubiera sido posible. A José Luis por sus consejos y su sabiduría.

A Ricardo por ayudarme siempre con una sonrisa aunque fuera ir a abrir agujeros a una pared un sábado por la tarde.

A mis compatriotas Alberto y Edelyn que me han hecho sentir que no estoy tan lejos de casa.

A quienes han sido casi como mis hermanos Pilar, Juan Camilo, Carla, Eszter, Carolina, Nora y Rim, que me han brindado su amistad de forma incondicional durante estos años y me han aguantado en mis peores momentos (cosa que no es tarea fácil).

A mis amigos Julio y Hansel por los buenos momentos.

A los del 1.01 Maricruz, Roberto, Joanna, Mónica y Concha por sus consejos y toda su ayuda sobre todo por enseñarme a clonar plantas de tomate. También agradecer a Ana Berbel por toda su ayuda con las in situ.

A los de “in vitro”, en especial a Peter, Teresa y Benito por ayudarme siempre y responder pacientemente a toooooooooodas mis preguntas.

A Nico y Paula por las risas y el apoyo.

A los del UPSC en Umeå, en especial a Thomas Moritz, Inga-Britt e Ilka por su ayuda con mis “Giberelinas”. También agradecer a aquellos que hicieron posible que mi paso por Umeå no fuera tan “frío” Kate, Liudmila, Ilara, Christian y Viqar.

Y finalmente agradecer a todas aquellas personas que me han apoyado de una forma u otra durante este tiempo. A todos aquellos que me han dedicado su tiempo y me han apoyado y han hecho que me sienta bien y crezca personal y profesionalmente.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	15
ABSTRACT	17
RESUM	19
OBJETIVOS.....	21
Introducción.....	25
1. Las giberelinas: aspectos históricos y estructura química	25
1.1 Aspectos históricos.....	25
1.2 Estructura química.....	27
2. Biosíntesis de giberelinas.....	28
2.1.1. Primera etapa: Síntesis de <i>ent</i> -kaureno a partir de GGDP	28
2.1.2. Segunda etapa: Conversión de <i>ent</i> -kaureno a GA ₁₂	28
2.1.3. Tercera etapa: Síntesis de GAs de 19 y 20 carbonos.....	30
3. Inactivación	30
4. Genes que codifican enzimas de biosíntesis y catabolismo de giberelinas	32
4.1. Genes de biosíntesis y catabolismo en tomate	32
5. Percepción y Respuesta a GAs	34
5.1 El receptor de GAs: GID1	35
5.2 Proteínas DELLA	36
5.3 Complejo SCF E3-Ubiquitin Ligasa.....	37
6. Homeostasis del contenido de GAs activas	38
7. Inhibidores del metabolismo de GAs	39
8. Procesos fisiológicos controlados por GAs	39
8.1. Desarrollo vegetativo	39
8.2. Desarrollo reproductivo.....	41
9. El RNA de interferencia como herramienta para estudios genéticos funcionales	43
10. Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L)	46
10.1 Arquitectura de la planta y desarrollo vegetativo.	47
10.2 Desarrollo reproductivo.....	48
10.2.1 Fructificación.	50
10.2.1.1 Polinización.....	51
10.2.1.2 Fertilización.	51
10.2.1.3 Crecimiento del fruto.....	53
10.3 El cultivar Micro-Tom.....	54
MATERIALES.....	59
1. Material biológico	59
2. Secuencias.....	59
2.1 Cebadores	59
2.2 Secuencias empleadas en el fragmento shRNA2ox	60
3. Vectores	61
4. Kits y Enzimas	61
4.1 Kits	61
4.2 Enzimas	61
5. Columnas empleadas en la purificación de GAs.	62
6. Soluciones y medios de cultivo.	62
6.1 Soluciones y medios de cultivo usadas en cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	62
6.1.1 Uso de los medios de cultivo en la transformación de tomate.	63

6.2 Medios de cultivo específicos de bacterias	63
MÉTODOS	64
1. Condiciones de cultivo y tratamientos hormonales en plantas	64
1.1 Cultivo <i>in vitro</i>	64
1.2 Cultivo en condiciones de invernadero	64
1.3 Tratamientos hormonales.	65
1.3. 1 Plántulas.....	65
1.3. 2 Plantas adultas	65
2. Métodos de biología molecular	65
2.1 Transformación de cepas bacterianas.....	65
2.2 Verificación de transformantes bacterianos mediante PCR.....	66
2.3 Purificación de ácidos nucleicos.....	67
2.3.1 Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	67
2.3.2 Extracción de DNA genómico de tejidos vegetales.....	67
2.3.3 Extracción de RNA de tejidos vegetales	67
2.4 Electroforesis en gel de agarosa	69
2.5 RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	69
3. Obtención plantas transgénicas de tomate.....	70
3.1. Silenciamiento múltiple genes <i>SIGA2ox</i> : Diseño de fragmento <i>shRNA2ox</i>	70
3.2. Silenciamiento gen <i>SIGA2ox1</i> : Diseño de fragmento <i>amiRNA2ox1</i>	72
3.3 Clonaje de fragmentos <i>shRNA2ox</i> y <i>amiRNA2ox1</i> usando tecnología Gateway.	72
3.4. Transformación genética de tomate	75
3.4.1 Obtención y pre-cultivo de explantes de hoja	75
3.4.2 Preparación del cultivo bacteriano.	75
3.4.3 Infección y lavado.	75
3.4.4 Inducción de organogénesis y desarrollo del sistema radicular	76
3.4.5 Aclimatación en condiciones de invernadero.....	76
4. Análisis de plantas transgénicas.....	77
4.1. Evaluación del nivel de ploidía	77
4.2. Segregación del gen <i>nptII</i> en la primera generación de plantas transgénicas (TG1).....	77
4.3. Genotipado plantas <i>35S::amiRNA2ox1</i> en la primera generación de plantas transgénicas (TG1) .	78
4. 4. Evaluación de caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo en las plantas transgénicas ..	78
4. 4. 1 Germinación	79
4. 4. 2 Longitud de hipocotilos y raíces de plántulas	79
4. 4. 3 Hábito de crecimiento y patrón de ramificación.....	79
4. 4. 4 Análisis del desarrollo de ovarios	81
4. 4. 5 Contenido en sólidos solubles (^o Brix)	81
4. 5. Cuantificación de niveles de giberelinas en las plantas transgénicas	81
5. Análisis estadístico.	85
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA FAMILIA SIGA2ox EN TOMATE	87
RESULTADOS I	89
1. Patrón de expresión de genes <i>SIGA2ox</i>	89
2. Patrón de expresión de genes <i>SIGA2ox</i> en ovarios.....	90
3. Regulación por retroalimentación de genes <i>SIGA2ox</i>	93
DISCUSIÓN I.	96
1. Patrón de expresión de genes <i>SIGA2ox</i>	96
2. Patrón de expresión de genes <i>SIGA2ox</i> en ovarios.....	96
3. Regulación por retroalimentación de genes <i>SIGA2ox</i>	97
CONCLUSIONES I	99

CAPÍTULO II: SILENCIAMIENTO MÚLTIPLE DE GENES SIGA2ox EN PLANTAS DE TOMATE	101
RESULTADOS II	103
1. Obtención del transgén <i>35S::shRNA2ox</i>	103
2. Obtención de plantas transgénicas de tomate <i>35S::shRNA2ox</i>	105
2.1 Eficacia de transformación	105
2.2 Segregación del gen <i>nptII</i> en la primera generación de plantas transgénicas (TG1).....	106
3. Evaluación de silenciamiento de genes <i>SIGA2ox</i> en plantas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i>	106
3.1 Silenciamiento de los genes <i>SIGA2ox</i> en tejidos vegetativos	107
3.2 Silenciamiento de genes <i>SIGA2ox</i> en tejidos reproductivos	108
3.3 Expresión de genes de biosíntesis en ovarios polinizados	110
4. Evaluación de características fenotípicas en plantas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i>	110
4.1 Desarrollo vegetativo	110
4.1.1 Germinación	110
4.1.2 Longitud de hipocotilo y raíz en plántulas	111
4.1.3 Morfología de plantas adultas	112
4.1.4 Arquitectura de la planta	112
4.1.4.1 Influencia de los brasinosteroides en el patrón de ramificación de las plantas transgénicas ..	116
4.2 Desarrollo reproductivo.....	117
4.2.1 Floración.....	117
4.2.2 Caracterización del fruto en las plantas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i>	118
4.2.3 Producción total de frutos por las plantas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i>	119
4.2.4 Capacidad partenocárpica de las líneas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i>	119
5. Cuantificación de niveles de giberelinas en plantas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i>	121
5.1 Cuantificación de niveles de giberelinas en tejidos reproductivos.....	122
5.2 Cuantificación de niveles de giberelinas en tejidos vegetativos	122
DISCUSIÓN II	125
1. Silenciamiento de genes <i>SIGA2ox</i> en plantas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i>	125
2. Contenido de GAs en plantas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i>	127
3. Efectos del silenciamiento de los genes <i>SIGA2ox</i> y la concentración de GAs activas en el desarrollo vegetativo de plantas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i>	127
3.1 Influencia de los brasinosteroides en el patrón de ramificación en las plantas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i>	130
4. Efectos del silenciamiento de los genes <i>SIGA2ox</i> y la concentración de GAs activas en el desarrollo reproductivo de plantas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i>	130
CONCLUSIONES II	133
 CAPÍTULO III: SILENCIAMIENTO DE GEN SIGA2ox1 EN PLANTAS DE TOMATE	135
RESULTADOS III	137
1. Obtención del transgén <i>35S::amiRNA2ox1</i>	137
2. Obtención de plantas de tomate transgénicas <i>35S::amiRNA2ox1</i>	138
2.1 Eficacia de transformación	138
2.2 Amplificación fragmento <i>amiRNA2ox1</i> en plantas transgénicas TG1.....	138
2.3 Segregación del gen <i>nptII</i> en la TG1	139
3. Evaluación de silenciamiento de gen <i>SIGA2ox1</i> en plantas transgénicas <i>35S::amiRNA2ox1</i>	140
4. Evaluación de características fenotípicas en plantas transgénicas <i>35S::amiRNA2ox1</i>	142
4.1 Desarrollo vegetativo	142
4.1.1 Longitud de hipocotilo y raíz en plántulas	142
4.1.2 Morfología plantas adultas	142
4.1.3 Hábito de crecimiento y patrón de ramificación	143
4.2 Desarrollo reproductivo.....	144

4.2.1 Floración.....	144
4.2.2 Caracterización del fruto en las plantas transgénicas <i>35S::amiRNA2ox1</i>	145
4.2.4 Capacidad partenocárpica de las líneas transgénicas <i>35S::amiRNA2ox1</i>	146
5. Cuantificación de niveles de giberelinas en plantas transgénicas <i>35S::amiRNA2ox1</i>	147
DISCUSIÓN III.	148
1. Silenciamiento del gen <i>SIGA2ox1</i> en plantas transgénicas <i>35S::amiRNA2ox1</i>	148
2. Efectos del silenciamiento del gen <i>SIGA2ox1</i> en los contenidos de GAs y en el desarrollo de las plantas transgénicas <i>35S::amiRNA2ox1</i>	149
CONCLUSIONES III	151
CONCLUSIONES FINALES	153
APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA	155
ANEXOS.....	159
REFERENCIAS.....	165

ABREVIATURAS

GAs Giberelinas
BR Brasinosteroides
ICI Imperial Chemical Industries
UCLA University of California, Los Ángeles
GAs C-19 giberelinas de 19 carbonos
GAs C-20 giberelinas de 20 carbonos
GGDP GeranilGeranil Difosfato
IPP Isopentenil Difosfato
CPS *ent*-copalil difosfato sintasa
KS *ent*-kaureno sintasa
KO *ent*-kaureno oxidasa
KAO ácido *ent*-kaurenoico oxidasa
GA3ox 3 β -oxidasa de giberelinas
GA2ox 2 β -oxidasa de giberelinas
GA13ox 13-oxidasa de giberelinas
GA20ox 20-oxidasa de giberelinas
C19-GA2ox enzimas GA2ox que actúan sobre GAs de 19 carbonos
C20-GA2ox enzimas GA2ox que actúan sobre GAs de 20 carbonos
GAMT Giberelin Metil Transferasas
GID1 receptor de GAs Del inglés *Gibberellin Insensitive Dwarf-1*
LAB 198999 etil éster ácido carboxílico 3,5-dioxi-4-butiril-ciclohexano
PCB Paclobutrazol
MT cultivar Micro-Tom
DCL del inglés *Dicer Like*
AGO del inglés *Argonaute*
RISC del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*
RNA Ácido ribonucleico
mRNA Ácido ribonucleico mensajero
RNA_{dc} Ácido ribonucleico de doble cadena
RNA_{dc}^{21-24nt} Ácido ribonucleico de doble cadena de longitud entre 21 y 24 nucleótidos
RNA_{sc} Ácido ribonucleico de simple cadena
shRNA del inglés *short hairpin RNA*
miRNA del inglés *micro RNA*
pre-miRNA precursor del *micro RNA*
amiRNA del inglés *artificial micro RNA*
UTR región no traducida de un del inglés *Untranslated Region*
SAM meristemo apical del tallo del inglés *Shoot Apical Meristem*
MI meristemo inflorescente
MS meristemo simpodial
HT hoja terminal
QTL del inglés *Quantitative Trait Loci*
CMP células madre del polen
nt nucleótidos
pb pares de bases
kb kilobase
°C grados centígrados
nm nanómetro
 μ m micrómetro
mm milímetros
cm centímetros
r.p.m. revoluciones por minuto
% porcentaje

μF microfaradio
Ω Ohmio
V Voltio
kV kilovoltio
ng nanogramo
μg microgramo
mg miligramo
g gramo
FW peso fresco del inglés *Fresh Weight*
μL microlitro
mL mililitro
L litro
μM micromolar
mM milimolar
M Molar
s segundo
min minuto
h hora
DNA ácido desoxirribonucleico
dNTPs desoxinucleótidos trifosfato
PCR del inglés *Polymerase Chain Reaction*
RT-PCR del inglés *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*
RT-qPCR del inglés *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*
cdNA DNA complementario
EDTA etilen-diamino-tetraacetato sódico
cv cultivar
GA₃ Ácido giberélico
Tris 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
LB Luria Bertani (medio de cultivo bacteriano)
MS Murashige y Skoog (medio de cultivo de plantas)
MG medio de germinación
ME medio de enraizamiento
IAA ácido indolacético
IKZ de IAA, kinetina y zeatina
TG1 primera generación de plantas transgénicas
nptII gen que codifica la enzima neomicina fosfotransferasa
dpa días post antesis
GC-MS cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del inglés *Gas Chromatography Mass Spectrometry*
LC-MS cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas del inglés *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

RESUMENES

RESUMEN

Las giberelinas (GAs) son hormonas vegetales que regulan diversos procesos del desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas. Los niveles de GAs activas están regulados principalmente por enzimas de biosíntesis como las GA 20-oxidases (GA20ox) y GA 3-oxidases (GA3ox) y por enzimas de catabolismo como las GA 2-oxidases (GA2oxs). En tomate (*Solanum lycopersicum* L.) las GA2oxs están codificadas por una familia multigénica de 5 miembros, *SIGA2ox*. El objetivo principal de nuestro trabajo es estudiar el papel de los genes *SIGA2ox* en el desarrollo de tomate. Para determinar como están regulados estos genes estudiamos su patrón de expresión en tejidos vegetativos y reproductivos de tomate y en respuesta a variaciones en los niveles endógenos de GAs. Se observó que los genes *SIGA2ox* tienen un alto grado de redundancia y que, en plántulas, no son inducibles por GAs. Los genes con mayores niveles de expresión en los tejidos vegetativos resultaron ser los genes *SIGA2ox3*, -4 y -5 mientras que los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2* parecen ser importantes en el control del crecimiento del ovario ya que están reprimidos en ovarios polinizados en crecimiento y se inducen en ovarios no fertilizados.

Para estudiar la función de estos genes en el desarrollo de la planta se empleó un abordaje de genética reversa usando silenciamiento génico post-transcripcional múltiple y simple. Para el silenciamiento múltiple se usó una construcción de tipo horquilla con una secuencia quimérica homóloga a los cinco genes (*shRNA2ox*) y para el silenciamiento del gen *SIGA2ox1* se usó una construcción de tipo micro-RNA artificial (*amiRNA2ox1*). Ambas construcciones indujeron el silenciamiento, siendo éste más eficiente cuánto más abundante es el mensajero diana. El silenciamiento múltiple inducido por la construcción *35S::shRNA2ox* provocó un incremento significativo de los niveles de la giberelina activa GA₄ en ovarios. Además, los ovarios no fertilizados crecían mucho más en las plantas transgénicas que en las plantas silvestres (al menos 30 veces más) y presentaban cierto grado de capacidad partenocárpica que no poseían las plantas silvestres, desarrollando entre un 5 y un 37% de frutos partenocárpicos. Los ovarios polinizados de las plantas transgénicas se desarrollaban algo más rápido inicialmente, pero producían frutos del mismo tamaño a los silvestres. Estos resultados sugieren que el papel de las GAs en el crecimiento del fruto de tomate puede estar mediado, al menos en parte, por las GA 2-oxidases. En el desarrollo vegetativo de estas plantas no se detectaron los efectos fenotípicos clásicos de la superproducción de GAs, ni se detectó ningún incremento en los niveles de GAs en tallos ni en ápices. Sin embargo se observó una inhibición significativa de la ramificación lateral que parecía deberse a un mayor contenido de GA₄ detectado en las yemas axilares. Este fenotipo, no esperado, era suprimido eficientemente cuando se inhibía la síntesis de GAs mediante la aplicación del inhibidor paclobutrazol. Estos resultados sugieren un papel para las GAs como represores de la ramificación y que las GA 2-oxidases son importantes en el control

de la aparición de ramas laterales mediado por GAs. En las plantas *35S::amiRNA2ox1*, donde solo se silenció el gen *SIGA2ox1*, a diferencia de lo que ocurre en las plantas de silenciamiento múltiple, no se detectaron cambios en los niveles de GAs activas, ni alteraciones en la ramificación, ni se mostraron efectos reproducibles sobre la partenocarpia. De estos resultados se deduce que el silenciamiento del gen *SIGA2ox1* no es suficiente para inducir cambios significativos en el fenotipo de las plantas de tomate probablemente debido a la redundancia génica. En resumen, las GA 2-oxidasas parecen tener un papel en la regulación de los niveles de GAs en los ovarios y en las yemas axilares de tomate y su silenciamiento génico puede inducir crecimiento partenocárpico de los ovarios e inhibición de la ramificación.

ABSTRACT

Gibberellins (GAs) are phytohormones that regulate a wide range of developmental processes in plants. Levels of bioactive GAs are regulated by biosynthetic enzymes: GA 20-oxidases (GA20ox), GA 3-oxidases (GA3ox) and catabolic enzymes: GA 2-oxidases (GA2oxs). In tomato (*Solanum lycopersicum* L.) GA2oxs are encoded by a small multigenic family composed of five genes, *SIGA2ox*. The main objective of our work is to study the role of GA2ox enzymes in the development of tomato plants. First, we studied the expression pattern of *SIGA2ox* genes in vegetative and reproductive tissues of tomato and its regulation. These genes showed a high degree of redundancy in their expression and were unresponsive to variations in levels of endogenous GAs in seedlings. The genes with higher expression levels in vegetative tissues were *SIGA2ox3*, *-4* and *-5* while *SIGA2ox1* and *SIGA2ox2* genes appear to be important controlling ovary growth since their expression was repressed in pollinated developing ovaries and was induced in unfertilized ovaries.

To study the role of these genes in the development of tomato plants we employed a reverse genetic approach, using simple and multiple post-transcriptional gene silencing. For multiple silencing, a short-hairpin RNA (shRNA2ox) chimeric construction was used with a sequence homologous to the five genes and for the silencing of only *SIGA2ox1* we used an artificial micro-RNA (amiRNA2ox1) construction. Both constructs induced the silencing of all target genes, but the magnitude of mRNA reduction was different for each gene depending on the tissue and the developmental stage, being more efficient for the most abundant targets mRNA. The silencing of *SIGA2ox* genes in *35S::shRNA2ox* plants induced a significant increase in the levels of active GA₄ in ovaries. Unfertilized ovaries of transgenic plants were much bigger than wild type ovaries (more than 30 times) and they were also able to develop parthenocarpically with a certain frequency (5-37%). Pollinated ovaries, although develop faster, produced fruits of similar size to wild type fruits. In the vegetative development of the plants the classical phenotypic effects due to overproduction of GAs were not detected, but inhibition of the side branches and also a higher content of GA₄ in the axillary buds were observed. This unexpected phenotype was reverted in the transgenic plants when GAs levels were reduced by applying a GA biosynthesis inhibitor. These results suggest that GAs are negative regulators of branching and that GA 2-oxidases are important in the control of branching mediated by GAs. In *35S::amiRNA2ox1* plants, where only *SIGA2ox1* gene was silenced, unlike what happens in multiple silencing plants, no changes were detected in the levels of active GAs, neither alterations on the branching pattern or consistent effect on parthenocarpy. From these results it follows that *SIGA2ox1* silencing gene is not enough to induce significant changes in the phenotype of the tomato plants probably due to gene redundancy. In summary, GA 2-oxidases

seem to be important in the regulation of GA levels in tomato ovaries and axillary buds, and their silencing may be responsible of parthenocarpic growth and inhibition of branching.

RESUM

Les giberelines (GAs) son hormones vegetals que regulen diversos processos del desenvolupament vegetatiu i reproductiu de les plantes. Els nivells de GAs actives estan regulats principalment per enzimes de biosíntesis com les GA 20-oxidases (GA20ox) i GA 3-oxidases (GA3ox) i per enzimes de catabolisme com les GA 2-oxidases (GA2ox). En tomaca (*Solanum lycopersicum* L.) les GA2oxs estan codificades per una familia multigénica de 5 membres, *SIGA2ox*. L'objectiu principal de nostre treball es estudiar el paper dels gens *SIGA2ox* en el desenvolupament de tomaca. Per a determinar com aquests estos gens estudiem el seu patró d'expressio en teixits vegetatius i reproductius de tomaca i en resposta a variacions en els nivells endogens de GAs. S'observà que els gens *SIGA2ox* tenen un alt grau de redundancia i que, en plantules, no son induïbles per GAs. Els gens en majors nivells d'expressió en els teixits vegetatius, resultaren ser els gens *SIGA2ox3*, *-4* i *-5* mentres que els gens *SIGA2ox1* i *SIGA2ox2* semblen ser importants en el control del creiximent de l'ovari ja que estan reprimits en ovaris polinitzats en creiximent i s'indueixen en ovaris no fertilitzats. Per a estudiar la funcio d'aquests gens en el desenvolupament de la planta es va fer servir un abordatge de genètica reversa utilitzant silenciament genètic post-transcripcional multiple i simple. Per al silenciament multiple es va fer una construcció de tipus forqueta en una seqüencia quimerica homolega als cinc gens (*shRNA2ox*) i per al silenciament del gen *SIGA2ox1* s'usà una construcció de tipus micro-RNA artificial (*amiRNA2ox1*). Les dos construccions induïren el silenciament, sent més eficient quant mes abundant es el missatger diana. El silenciament multiple induït per la construcció *35S::shRNA2ox* provocà un increment significatiu dels nivells de la giberelina activa GA₄ en ovaris. Ademes els ovaris no fertilitzats creixien molt més en les plantes transgèniques que en les plantes silvestres (al menys 30 vegades mes) i presentaven cert grau de capacitat partenocarpica que no posseïen les plantes silvestres, desenvolupent entre un 5 i un 37% de fruits partenocarpics. Els ovaris polinitzats de les plantes transgèniques se desenvolupaven més rapid inicialment, pero produïen fruits del mateix tamany que els silvestres. Aquests resultats suggerixen que el paper de les GAs en el creiximent del fruit de tomaca pot estar mitjançant, al menys en part, per les GA 2-oxidases. En el desenvolupament vegetatiu d'aquestes plantes no se detectaren els efectes fenotípics clàssics de la superproducció de GAs, ni se detectà cap increment en els nivells de GAs en tiges ni en àpecx. No obstant s'observà una inhibició significativa de la ramificació lateral que semblava deure's a un major contingut de GA₄ detectat en els gemma axilars. Aquest fenotip, no esperat, era suprimit eficientment quan s'inhibïa la síntesis de GAs mitjançant l'aplicació de l'inhibidor paclobutrazol. Aquests resultats suggerixen un paper per les GAs com repressors de la ramificació i que les GA 2-oxidases son importants en el control de l'aparicio de branques laterals mediat per per GAs. En les plantes *35S::amiRNA2ox1*, on només se silencià el gen *SIGA2ox1*, a diferencia del que passa en les plantes de silenciament múltiple, no se detectaren canvis en els nivells de GAs actives, ni

alteracions en la ramificació, ni se mostraren efectes reproduïbles sobre la partenocarpia. D'aquests resultats se dedueix que el silenciament del gen *S/GA2ox1* no es suficient per a induir canvis significatius en el fenotip de les plantes de tomaca provablement degut a la redundància gènica. En resum, les GA 2-oxidases semblen tindre un paper en la regulació dels nivells de GAs en els ovaris i en els gemma axilars de tomaca i el seu silenciament genètic pot induir creixement partenocarpic dels ovaris i inhibició de la ramificació.

OBJETIVOS:

Las GAs son importantes en el control de distintos procesos del desarrollo de tomate. En su metabolismo intervienen los enzimas GA 2-oxidasas regulando los niveles de GAs activas a través de su inactivación. El objetivo principal de este trabajo es estudiar el papel de los enzimas GA 2-oxidasas en el desarrollo de tomate. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar el patrón de expresión de los genes *SIGA2ox* en tejidos vegetativos y reproductivos de plantas de tomate (cv. Micro-Tom) y su regulación en respuesta a variaciones en los niveles endógenos de giberelinas.
2. Obtener mutantes de pérdida de función de genes *SIGA2ox* en tomate mediante silenciamiento génico para evaluar el impacto sobre el metabolismo de giberelinas y el desarrollo vegetativo y reproductivo de la planta.

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. Las giberelinas: aspectos históricos y estructura química

1.1 Aspectos históricos

Las giberelinas (GAs) son un grupo de compuestos orgánicos que actúan como reguladores endógenos del crecimiento controlando 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 Phillips, 2000; Yamaguchi y Kamiya, 2000; Hedden y Thomas, 2012).

La historia de las GAs se remonta a principios del siglo XIX en Japón, donde se describe una enfermedad que afectaba los cultivos de arroz y provocaba cuantiosas pérdidas. Esta enfermedad recibió, por parte de los agricultores el nombre de *bakanae*, término que pudiera traducirse como “plántulas tontas”. Las plantas afectadas presentaban un crecimiento excesivo de tallos y brotes además de hojas más pálidas y tallos más finos que se partían con facilidad. En el año 1898 el fitopatólogo japonés Shotaro Hori identifica a un hongo del género *Fusarium* (probablemente *Fusarium heterosporium* Nees) como agente causal de la enfermedad (Hori, 1898). Posteriormente, en el año 1912, otro fitopatólogo llamado Kenkichi Sawada publica un artículo en la revista *Formosan Agricultural Review* titulado “The Diseases of Crops in Taiwan”, en el cual sugiere que la elongación de los tallos de arroz a consecuencia de la infección con el hongo *bakanae* puede deberse a un estímulo proveniente de las hifas del hongo (Tamura, 1991).

Luego, entre los años 1919 y 1926 Eiichi Kurosawa después de grandes esfuerzos logra obtener filtrados libres del agente infeccioso y reproducir los síntomas en plantas sanas (Kurosawa, 1926). Los aportes más valiosos de los trabajos de Kurosawa fueron:

- El agente infeccioso secreta una toxina que induce la elongación de los tallos de las plantas de arroz.
- La toxina además de estimular el crecimiento del tallo inhibe la formación de clorofila y el crecimiento de las raíces.
- La toxina induce efectos similares en otras especies de plantas.
- La toxina no pierde actividad luego de incubarla a 100°C durante 4h (esto descarta la naturaleza enzimática de la toxina).

En los años 30 el científico alemán H. W. Wollenweber corrige la clasificación taxonómica del hongo, nombrándose en su estadio imperfecto o asexual *Fusarium moniliforme* (Sheldon) y en su estadio perfecto o sexual *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr. Los términos “Fujikuroi” y “Saw” se derivan de los nombres de dos fitopatólogos japoneses Yosaburo Fujikuro and Kenkichi Sawada y el término “Wr” proviene de Wollenweber (Wollenweber, 1931; Wollenweber y

Reinking, 1935). Unos años más tarde, en 1935 Tejiro Yabuta y Yusuke Sumiki aíslan “la toxina” y proponen llamarla “Giberelina”, siendo la primera vez que aparece este término en la literatura (Yabuta y Sumiki, 1938). Tres años más tarde, en 1938 Yabuta y Sumiki obtuvieron dos principios activos en forma cristalina y los llaman Giberelinas A y B, aunque en el año 1941 se intercambiaron los nombres porque la Giberelina A mostró ser inactiva (Tamura, 1991).

Durante la Segunda Guerra Mundial se interrumpen los trabajos del grupo de Yabuta y Sumiki y no se retoman hasta los años 50, década en la que son atraídos a este campo investigadores estadounidenses y del Reino Unido quienes comienzan trabajos en paralelo hasta aislar y caracterizar física y químicamente el “Ácido Giberélico o GA₃” (Tamura, 1991). En los Estados Unidos los primeros trabajos sobre GAs datan del año 1950, donde dos grupos trabajaban para desarrollar un protocolo de fermentación que permitiera obtener y extraer GAs para su uso en la agricultura. Un grupo pertenecía a la Unidad de Investigación en Camp Dietrick, Maryland, liderado por John E. Mitchell y el otro grupo pertenecía a la Región Norte del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos radicado en Peoria, Illinois y estaba dirigido por el investigador Frank H Stodola. Ambos grupos realizaron fermentaciones para obtener GAs pero por desgracia el compuesto que aislaban resultaba inactivo (Tamura, 1991). En el año 1951, Sumiki viajó a los Estados Unidos y conoció a Frank H Stodola. Posteriormente Sumiki envió algunas de sus cepas a Stodola pero se requirieron muchos intentos hasta lograr un proceso de fermentación exitoso en la obtención de GAs activas biológicamente. Finalmente en el año 1955 Stodola logró aislar exitosamente dos GAs. Uno de los compuestos era idéntico a la Giberelina A, aislada por el grupo de Yabuta y Sumiki pero el otro difería de la Giberelina A así que recibió el nombre de Giberelina X (Stodola *et al*, 1955). En la misma época un grupo de investigadores del Reino Unido, de los Laboratorios de Investigación en Akers ICI (Imperial Chemical Industries) formado por Philip Curtis, Brian Cross, John Grove, Jake MacMillan y Paddy Mulholland aislaron una nueva giberelina que poseía propiedades físicas diferentes de la Giberelina A, aislada por los grupos japoneses y recibió el nombre de “Ácido Giberélico” (Curtis y Cross, 1954). Las muestras se intercambiaron entre los grupos de Stodola y Grove y se estudiaron sus propiedades físico-químicas. La conclusión final fue que el “Ácido Giberélico” y la Giberelina X eran el mismo compuesto y de esta forma el nombre “Ácido Giberélico” se aceptó para los dos grupos (Tamura, 1991).

También en la década de los 50 comenzaron a aparecer los primeros reportes de giberelinas en plantas superiores. Los primeros reportes fueron hechos por Margaret Radley del ICI en guisante en el año 1956 (Radley, 1956) y por Bernard Phinney de la UCLA en plantas de maíz (Phinney *et al*, 1957). En estos trabajos se hablaba de que las plantas producían sustancias con un efecto biológico similar a las GAs. A partir de este momento los científicos centraron sus esfuerzos en aislar GAs a partir de extractos vegetales, siendo Jake MacMillan de los

laboratorios ICI el primero en aislar, en 1958, GAs a partir de semillas de *Phaseolus multiflorus*, conocido actualmente como *Phaseolus coccineus* (MacMillan y Suter, 1958).

Después del año 1952 se comenzó a dilucidar, tanto por científicos estadounidenses como japoneses, la estructura química de varias de las GAs. Las primeras GAs en aislarse y caracterizarse fueron GA₁ y GA₄ de plantas y GA₂ y GA₃ de hongos por el grupo de la Universidad de Tokyo dirigido por Nobutaka Takahashi y Saburo Tamura entre los años 1955 y 1957 (Takahashi *et al*, 1955; Takahashi *et al*, 1957). En los Estados Unidos la primera GA aislada fue GA₅ en 1959 por West y Pinney (West y Pinney, 1959). En la actualidad se conocen 136 GAs diferentes, presentes en plantas, hongos y bacterias (<http://www.plant-hormones.info/gibberellins.htm>) a las que se les ha asignado un número (GA₁, 2, 3...n) según el orden cronológico de su descubrimiento.

1.2 Estructura química

Las GAs son ácidos diterpenos tetracíclicos, cuya estructura básica está constituida por un anillo de *ent*-giberelano (Figura I.1). Las GAs se clasifican en dos grupos atendiendo al número de átomos de carbono presentes en el esqueleto de *ent*-giberelano: las GAs con 20 átomos de carbono (C-20) y las GAs con 19 átomos de carbono (C-19) (Figura I.1). Las GAs C-20 presentan varios estados de oxidación del carbono 20 que se pueden encontrar como un grupo metilo (-CH₃), hidroximetilo (-CH₂OH), aldehído (-CHO) o carboxilo (-COOH). Las GAs C-20, que poseen un grupo aldehído en el C-20 pueden perder ese carbono por descarboxilación oxidativa formándose una γ -lactona y dando lugar a las GAs C-19 entre las que se encuentran las GAs activas (Talón, 2000).

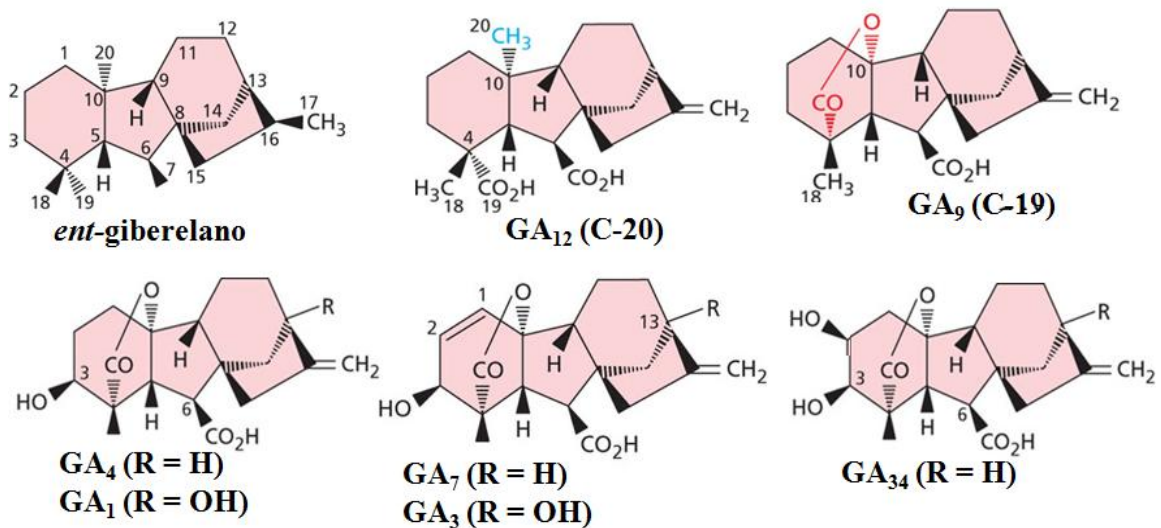


Figura I.1. Estructura química del *ent*-giberelano, precursores de GAs C-20 (GA₁₂) y C-19 (GA₉), GAs biológicamente activas C-19 (GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇) y GA inactiva GA₃₄.

De las 136 GAs descritas actualmente, sólo algunas pocas poseen actividad biológica en la regulación del desarrollo de las plantas. Las principales son la GA₁, GA₃, GA₄, GA₅ y GA₇, las

restantes GAs son compuestos precursores o de degradación de las GAs activas. Las formas activas son GAs C-19 con un grupo β -hidroxilo en el C-3, un grupo carboxilo (-COOH) en el C-6 y forman una lactona entre los carbonos C-4 y C-10 (Figura I.1) (Yamaguchi, 2008). Estas modificaciones de la estructura química son claves para la actividad biológica de las GAs mientras que la adición de un grupo hidroxilo en el C-2 de las GAs activas (Figura I.1) provoca la pérdida de la actividad biológica (Yamaguchi, 2008).

2. Biosíntesis de giberelinas

La ruta de biosíntesis de GAs es bastante compleja (Figura I.2), involucra tres tipos diferentes de enzimas: ciclasas, monooxigenasas dependientes de citocromo P450 y dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2ODDs) y ocurre en tres compartimentos celulares diferentes: plastidios, retículo endoplasmático y citoplasma (Yamaguchi, 2008). El precursor de la biosíntesis de GAs es el GeranilGeranilDifosfato (GGDP), compuesto derivado del Isopentenil Difosfato (IPP) del metabolismo de isoprenoides (Kasahara *et al*, 2002).

La biosíntesis de GAs en plantas superiores se divide en tres etapas: síntesis de *ent*-kaureno a partir de GGDP, conversión de *ent*-kaureno a GA₁₂ y síntesis de GAs de 19 y 20 carbonos a partir de GA₁₂ (Yamaguchi, 2008).

2.1.1. Primera etapa: Síntesis de *ent*-kaureno a partir de GGDP

En la primera parte de la ruta de biosíntesis de GAs participan enzimas de tipo ciclasas y ocurre en los plastidios. Esta etapa se inicia con la ciclación del GGDP a *ent*-copalildifosfato (CDP), paso catalizado por el enzima *ent*-copalildifosfato sintasa (CPS) (Figura I.2). Finalmente el CDP es convertido a *ent*-kaureno por acción del enzima *ent*-kaureno sintasa (KS) (Yamaguchi, 2008). Los enzimas CPS y KS se localizan en los plastidios. El enzima CPS es una ciclasa de tipo II que protona un doble enlace isoprenoide para generar un carbocatión intermedio reactivo y el enzima KS es una ciclasa de tipo I que cataliza la ionización de un grupo difosfato de isoprenoides para generar un carbocatión intermedio reactivo (Köksal *et al*, 2011; Hedden y Thomas, 2012)

2.1.2. Segunda etapa: Conversión de *ent*-kaureno a GA₁₂

La segunda etapa ocurre en la membrana del retículo endoplasmático y está catalizada por enzimas de tipo monooxigenasas dependientes de citocromo P450 (Yamaguchi, 2008). El *ent*-kaureno sintetizado en la etapa anterior es oxidado a *ent*-kaurenol, *ent*-kaurenal y ácido *ent*-kaurenoico por el enzima *ent*-kaureno oxidasa (KO) (Figura I.2). A continuación, el ácido *ent*-kaurenoico es oxidado a ácido *ent*-7 α -hidroxi-kaurenoico, el cual, tras una contracción del anillo B produce GA₁₂-aldehído que es oxidado finalmente a GA₁₂, la primera GA de la ruta y precursora de todas las GAs de la ruta en plantas superiores (Hedden y Thomas, 2012). Estos tres últimos pasos son catalizados por el mismo enzima que es la ácido *ent*-kaurenoico oxidasa

(KAO). Ambos enzimas se encuentran localizadas en la pared del retículo endoplasmático (Yamaguchi, 2008).

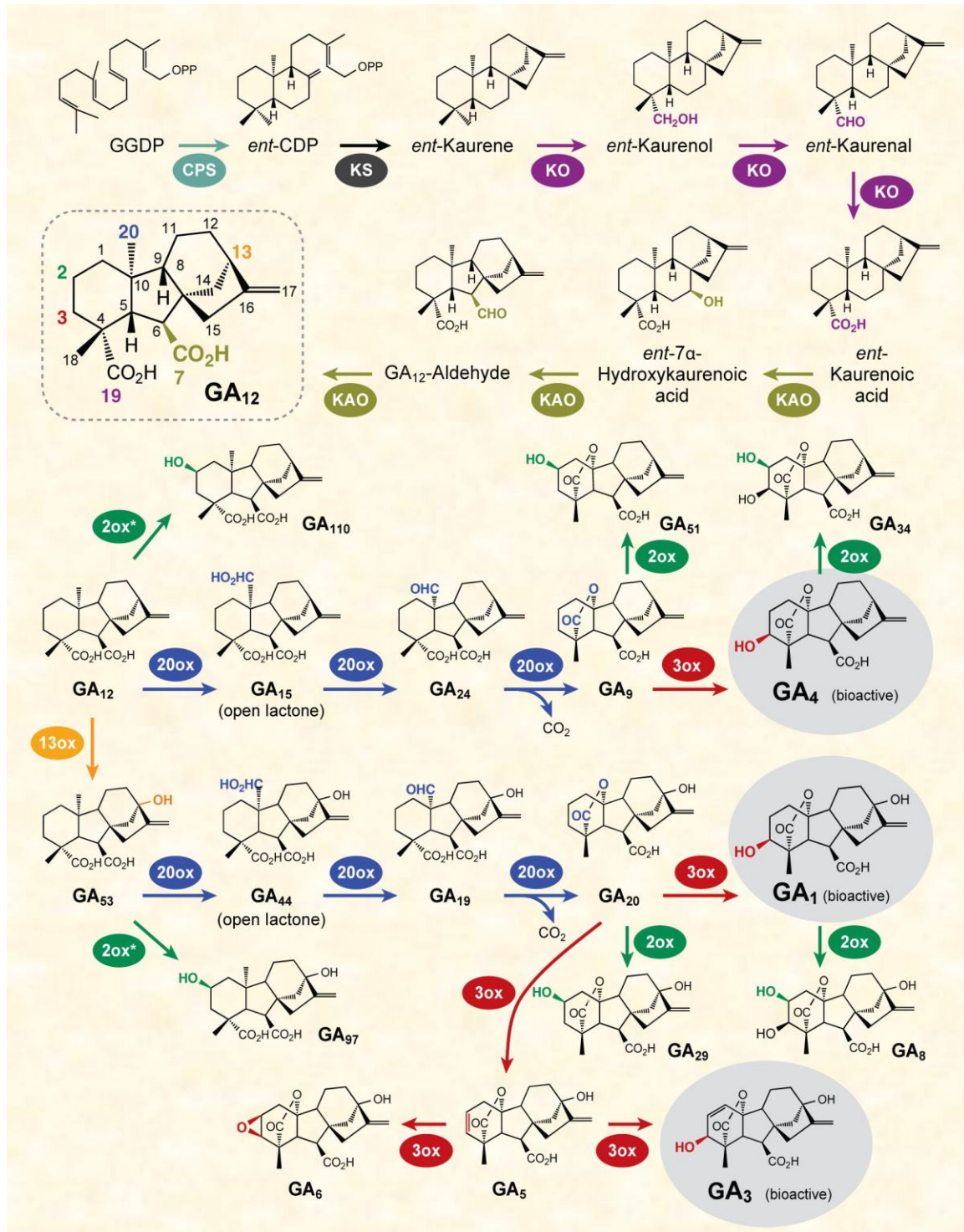


Figura I.2. Esquema de la ruta del metabolismo de GAs (Yamaguchi, 2008).

GGDP: GeranylGeranylDifosfato; CPS: ent-copalil difosfato sintasa; KS: ent-kaureno sintasa; KO: ent-kaureno oxidasa; KAO: Ácido ent-kaurenoico oxidasa; 13ox: GA 13-oxidasa; 20ox: GA 20-oxidasa; 3ox: GA 3-oxidasa; 2ox: GA 2-oxidasa.

2.1.3. Tercera etapa: Síntesis de GAs de 19 y 20 carbonos

La tercera parte de la vía de biosíntesis de las GAs ocurre en el citoplasma de las células tiene como punto de partida la GA₁₂. En esta etapa la ruta puede seguir dos vías y esto varía según la especie, e incluso puede ser diferente entre tejidos de una misma planta (Yamaguchi, 2008; Magome *et al*, 2013). Las dos rutas principales (Figura I.2) son:

Ruta de la hidroxilación temprana en el C-13. El GA₁₂ es oxidado en el C-13 por acción del enzima GA 13-oxidasa (GA13ox, una monooxigenasa P450) transformándose en GA₅₃, el primer miembro de la ruta de síntesis de la 13-hidroxilación, ruta predominante en la mayoría de las especies. Posteriormente, el C-20 de la GA₅₃ sufre dos oxidaciones consecutivas catalizadas por GA 20-oxidasa (GA20ox) dando GA₄₄ y GA₁₉. La ruta de la 13-hidroxilación continúa con la eliminación del C-20 de GA₁₉ sintetizándose GA₂₀, que es la primera GA C-19 de la ruta. La incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 3β de la GA₂₀, catalizado por el enzima GA 3-oxidasa (GA3ox), produce la GA activa GA₁ (Yamaguchi, 2008). En tomate esta ruta es la predominante (Serrani *et al*, 2007a).

Ruta de la no hidroxilación temprana en el C-13. En esta ruta el C-20 de GA₁₂, por acción del enzima GA20ox, se oxida dos veces dando origen a GA₁₅ y GA₂₄. La posterior descarboxilación o eliminación del C-20 de GA₂₄ da origen a GA₉, que es la primera GA C-19 de esta ruta. Todos los pasos hasta la GA₉ están catalizados por la GA20ox. Finalmente, los enzimas GA3ox incorporan un grupo hidroxilo en la posición β del C-3 de GA₉ y esto da lugar a la otra GA activa GA₄ (Yamaguchi, 2008).

3. Inactivación

Es de vital importancia para las plantas regular de forma eficiente y precisa el contenido de GAs. En el caso del metabolismo de GAs esto se realiza por mecanismos de inactivación como la 2β-hidroxilación, metilación y epoxidación, siendo la inactivación de GAs C-19 por 2β-hidroxilación el más relevante (Rieu *et al*, 2008; Hedden y Thomas, 2012). La reacción de 2β-hidroxilación, que provoca la pérdida irreversible de actividad biológica, consiste en la adición de un grupo hidroxilo (-OH) en el C-2 de la estructura de las GAs y está catalizada por los enzimas GA 2-oxidasa (GA2ox) (Figura I.2) (Thomas *et al*, 1999). Los enzimas GA2ox son enzimas de tipo 2ODD, al igual que los enzimas de biosíntesis GA20ox y GA3ox y están presentes en casi todas las especies vegetales estudiadas.

Existen dos tipos diferentes, separados evolutivamente, de enzimas GA2ox: los que utilizan como sustrato las GAs C-19 (C19-GA2ox) (Thomas *et al*, 1999) y los que utilizan como sustrato las GAs C-20 (C20-GA2ox) (Schomburg *et al*, 2003; Lee y Zeevaart, 2005) (Figura I.3).

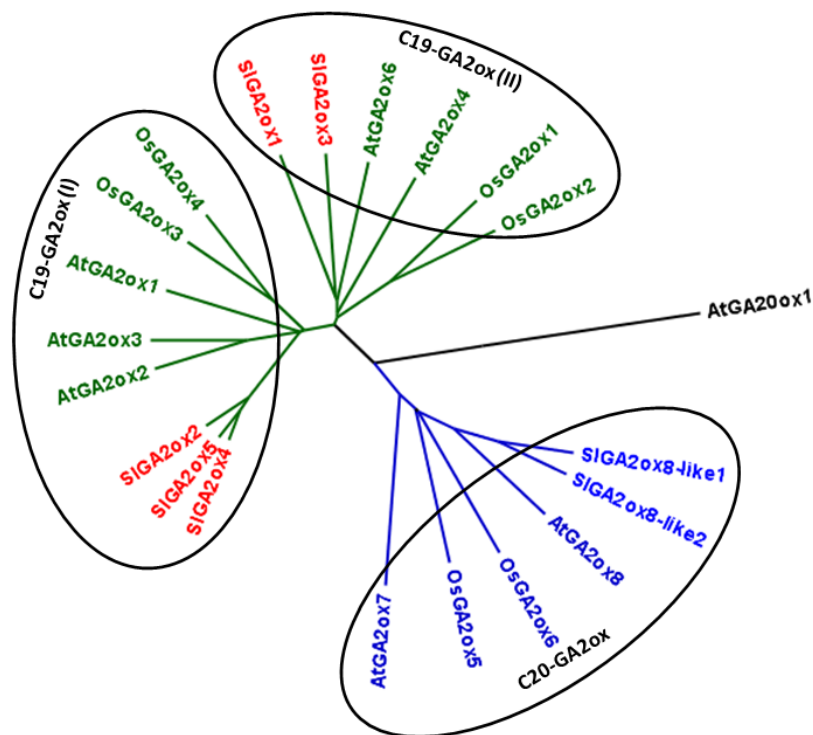


Figura I.3. Árbol filogenético basado en la comparación de las secuencias proteicas de los enzimas GA2ox descritas en *Arabidopsis thaliana*, arroz y tomate. La secuencia del enzima GA20ox1 de *Arabidopsis* se empleó para enraizar el árbol. En verde aparecen señalados los enzimas que emplean GAs C-19 como sustrato y en azul las enzimas que emplean GAs C-20 como sustrato. En rojo aparecen señalados los genes descritos y caracterizados en tomate.

Los enzimas C19-GA2ox actúan sobre las GAs activas GA₁ y GA₄ y sus precursores GA₂₀ y GA₉ transformándolos en los productos inactivos GA₈, GA₃₄, GA₂₉ y GA₅₁ respectivamente (Figura I.2). A su vez los enzimas C19-GA2ox pueden subdividirse en dos grupos, de acuerdo a su composición de aminoácidos (Figura I.3): los C19-GA2ox (I), algunos de las cuales pueden ser bifuncionales catalizando dos oxidaciones consecutivas (Thomas *et al*, 1999) y los C19-GA2ox (II) que catalizan una sola reacción de oxidación en el C-2 de sus sustratos (Serrani *et al*, 2007a). Los enzimas C20-GA2ox actúan sobre las GAs GA₁₂ y GA₅₃ convirtiéndolas en los productos inactivo GA₁₁₀ y GA₉₇ respectivamente (Figura I.2) (Schomburg *et al*, 2003; Lee y Zeevaart, 2005).

Además de la hidroxilación del C-2, catalizada por los enzimas GA2ox, existen otros mecanismos de inactivación de GAs como la epoxidación, la metilación y más recientemente descrito en *Arabidopsis* la hidroxilación del C-16 (Hedden y Thomas, 2012; Nomura *et al*, 2013). En arroz se ha descrito un enzima monooxigenasa dependiente de citocromo P450, codificada por el gen *EUI* (*elongated uppermost internode*) que cataliza la 16 α ,17-epoxidación de las GAs, GA₄, GA₉ o GA₁₂ de la ruta de la no hidroxilación temprana en C-13 (Zhu *et al*, 2006). La metilación se ha observado en *Arabidopsis thaliana* y se lleva a cabo por enzimas denominados GAMT (GA Metil Transferasas) pertenecientes al grupo SABATH de

metiltransferasas (Varbanova *et al*, 2007). Estos enzimas usan S-adenosin-1-metionina (SAM) como donante de grupo metilo y son capaces de metilar el grupo carboxilo del C-6 de las GAs, lo cual produce ésteres metilados de GAs (MeGAs) que no tienen actividad biológica (Varnabova *et al*, 2007; Xing *et al*, 2007). También en *A. thaliana* se ha descrito recientemente un enzima de tipo monooxigenasa dependiente de citocromo P450 denominada CYP714A1 que cataliza la adición de un grupo –OH en el C-16 de la GA₁₂ y la GA₉, dando lugar a compuestos inactivos (Nomura *et al*, 2013).

4. Genes que codifican enzimas de biosíntesis y catabolismo de giberelinas

En la actualidad se han clonado y caracterizado todos los genes de la ruta del metabolismo de GAs en varias especies (Figura I.2). El último enzima en ser clonado y caracterizado fue el enzima GA13ox en arroz (Magome *et al*, 2013). Los trabajos de caracterización han demostrado que la expresión de estos genes está regulada de acuerdo al tejido, estadio del desarrollo y determinados factores ambientales como por ejemplo la luz (Hedden y Thomas, 2012; Magome *et al*, 2013). Los enzimas que catalizan las dos primeras etapas de la biosíntesis de GAs, están codificados por uno o dos genes por lo que las mutaciones en estos genes suelen dar lugar a un déficit severo de GAs y fenotipos bastante extremos (Sun y Kamiya, 1994; Yamaguchi *et al*, 1998; Davidson *et al*, 2003; Davidson *et al*, 2004; Sakamoto *et al*, 2004). Los enzimas 2ODD que catalizan las reacciones de la última fase de la ruta están codificados por pequeñas familias multigénicas (Yamaguchi, 2008; Hedden y Thomas, 2012). En este caso, al existir varios genes para los enzimas 2ODD, generalmente las mutaciones simples no impactan significativamente en la ruta metabólica de las GAs y a menudo no se producen efectos fenotípicos apreciables (Yamaguchi, 2008). Existen algunas excepciones, en las que la mutación de un solo gen de la familia produce efectos sobre el metabolismo de GAs en la planta. Podemos citar los mutantes de *Arabidopsis thaliana*, *ga4* y *ga5* en los se afectan el gen de biosíntesis *AtGA3ox1* y *AtGA20ox1* respectivamente (Chiang *et al*, 1995; Xu *et al*, 1995). También encontramos el caso del mutante *slender* de guisante en el que solamente está mutado el gen *PsGA2ox1* (Lester *et al*, 1999; Martin *et al*, 1999). En estos casos, en que la altura de la planta estaba alterada de forma evidente y el gen mutado tenía expresión predominante en los tejidos vegetativos lo cual sugería que tenía el papel principal en el control de los niveles de GAs en ese tejido.

4.1. Genes de biosíntesis y catabolismo en tomate

En tomate se conoce la secuencia de todos los genes que codifican para enzimas de la ruta de biosíntesis, excepto para el enzima GA13ox (Tabla I.1). Hasta la fecha para los enzimas CPS, KS, KO y KAO existe solo un gen descrito (Imai *et al*, 1996; Falara *et al*, 2011; Li *et al*, 2012).

Tabla I.1. Genes que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de GAs en tomate.

ENZIMAS	GENES
CPS	- <i>SICPS</i> (mutante <i>gib-1</i>) Bensen y Zeevaart, 1990; Imai <i>et al</i> , 1996.
KS	- <i>SIKS</i> (mutante <i>gib-3</i>) Koorneef <i>et al</i> , 1990; Falara <i>et al</i> , 2011.
KO	- <i>SIKO</i> Li <i>et al</i> , 2012.
KAO	- <i>SIKAO</i> (mutante <i>gib-2</i>) Koorneef <i>et al</i> , 1990
GA20ox	- <i>SIGA20ox1</i> , <i>SIGA20ox2</i> , <i>SIGA20ox3</i> , <i>SIGA20ox4</i> Rebers <i>et al</i> , 1999; Serrani <i>et al</i> , 2008
GA3ox	- <i>SIGA3ox1</i> , <i>SIGA3ox2</i> Yang <i>et al</i> , 1998; Rebers <i>et al</i> , 1999.
GA2ox	- C19-GA2ox (I) : <i>SIGA2ox1</i> , <i>SIGA2ox3</i> Serrani <i>et al</i> , 2007a. - C19-GA2ox (II) : <i>SIGA2ox2</i> , <i>SIGA2ox4</i> , <i>SIGA2ox5</i> Serrani <i>et al</i> , 2007a. - C20-GA2ox : <i>SIGA2ox8-like1</i> (XP004232746.1), <i>SIGA2ox8-like2</i> (XP004248394.1),

Los mutantes deficientes en biosíntesis de GAs en tomate descritos hasta la fecha son *gib-1*, *gib-2* y *gib-3* y en ellos están afectados los enzimas CPS, KAO y KS respectivamente (Bensen y Zeevaart, 1990; Koorneef *et al*, 1990).

El gen *SICPS* se expresa en hojas y entrenudos pero no en raíces (Serrani *et al*, 2007a). Este gen también se expresa en flores y ovarios polinizados alcanzando su máximo de expresión en frutos pequeños de 10-20 días post-antesis (Rebers *et al*, 1999; Serrani *et al*, 2007a).

En tomate, los enzimas GA20ox están codificados por 4 genes (Rebers *et al*, 1999; Serrani *et al*, 2008). Estos genes se expresan tanto en tejidos vegetativos como reproductivos (Rebers *et al*, 1999; Serrani *et al*, 2007a). En raíces solo se detecta expresión del gen *SIGA20ox3* y en hojas y tallos se detecta expresión de los genes *SIGA20ox1*, *SIGA20ox2* y *SIGA20ox3*. En los tejidos reproductivos el gen *SIGA20ox1* se expresa en yemas florales y en frutos que se encuentran en los primeros estadios de desarrollo (hasta día 20 post-antesis). *SIGA20ox2* también se expresa en yemas florales y en los primeros estadios del desarrollo del fruto. El gen *SIGA20ox3* se expresa en ovarios de flores en antesis y durante los primeros estadios del fruto (Rebers *et al*, 1999; Serrani *et al*, 2007a). Varias evidencias experimentales apuntan a que la actividad de los enzimas GA20ox es crucial para el desarrollo del ovario, en particular el gen *SIGA20ox1*:

- La polinización induce un aumento significativo en la expresión de los genes *SIGA20ox1*, *SIGA20ox2* y *SIGA20ox3* junto a un aumento de la GA activa GA₁ (Serrani *et al*, 2007a).
- Al tratar ovarios no polinizados con el precursor de GAs GA₁₉ se observó que no se inducía el desarrollo del ovario, lo cual sugiere que la actividad enzimática de las GA20ox es limitante en el ovario (Serrani *et al*, 2007a).

- En ovarios del mutante partenocárpico *pat* de tomate la expresión del gen *SIGA20ox1* es constitutiva y esto coincide con un mayor contenido de GAs activas (Olimpieri *et al*, 2007).
- Plantas transgénicas donde se ha reducido la expresión del gen *SIGA20ox1* mostraron, además de reducción de altura, alteraciones de la morfología floral e infertilidad ocasionada por un desarrollo aberrante de las anteras y el polen (Olimpieri *et al*, 2011).

Los enzimas GA3ox catalizan el último paso de la biosíntesis de las GAs activas convirtiendo GA₂₀ y GA₉ a GA₁ y GA₄ respectivamente. Las GA3ox también están codificadas por pequeñas familias multigénicas. En tomate, las GA3ox están codificadas por 2 genes (Tabla I.1). Ambos genes se expresan en tejidos vegetativos y reproductivos. En ovarios la expresión del gen *SIGA3ox1* no presenta grandes diferencias entre ovarios polinizados y no polinizados hasta 20 días después de la antesis. En ovarios polinizados de 10 y 20 días la expresión de *SIGA3ox1* se concentra en las semillas en desarrollo (Serrani *et al*, 2007a). El gen *SIGA3ox2* está menos representado que el gen *SIGA3ox1* y en ovarios su expresión resulta indetectable luego del día de antesis (Serrani *et al*, 2007a). Estos resultados sugieren que la actividad GA3ox está presente en los ovarios aunque no es limitante para el desarrollo de los mismos (Serrani *et al*, 2007a).

En tomate las GA2ox están codificadas por 5 genes (Tabla I.1; Figura I.3). De acuerdo a su secuencia los genes *SIGA2ox2*, *SIGA2ox4* y *SIGA2ox5* se ubican en el grupo de los enzimas C19-GA2ox(I) y los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox3* se ubican el grupo de enzimas C19-GA2ox(II) (Serrani *et al*, 2007). Se detectaron transcritos de los cinco genes en diferentes tejidos de plantas de tomate (raíz, hoja, flor completa, ovarios, estambres, pétalos, sépalos y frutos en desarrollo) (Serrani *et al*, 2007a). Todos los genes se expresaron en ovarios no polinizados en el momento de la antesis y en las etapas tempranas del desarrollo del fruto; sin embargo, no se detectaron diferencias en el patrón de expresión entre ovarios polinizados y no polinizados que sugieran un papel de estos genes en el desarrollo del fruto (Serrani *et al*, 2007a). En el genoma de tomate también aparece la secuencia de dos enzimas GA2ox con una alta homología con el grupo de enzimas C20-GA2ox pero hasta la fecha no han sido caracterizadas.

5. Percepción y Respuesta a GAs

En la actualidad se conoce la mayor parte de los componentes que integran el mecanismo de percepción y señalización de GAs y sus interacciones (Hauvermale *et al*, 2012; Locascio *et al*, 2013a; Davière y Achard, 2013; Wang y Deng, 2013) y puede resumirse de la siguiente forma (Figura I.4):

En ausencia de GAs activas, las proteínas DELLA, componentes esenciales del mecanismo de señalización de GAs, se encuentran inhibiendo la transcripción de los genes que codifican para las proteínas que intervienen en los diversos procesos del desarrollo vegetal regulados por GAs como la germinación, la elongación del tallo y la floración entre otros. En presencia de GAs, éstas se unen a su receptor *GID1* y se forma el complejo GA-*GID1*. La unión de las GAs al receptor promueve la poliubiquitinación de las proteínas DELLA por parte del complejo SCF E3 ubiquitin ligasa. La adición de moléculas de ubiquitina es un mecanismo de regulación celular para dirigir la degradación de proteínas celulares por el proteasoma 26S (Kelley y Estelle, 2012). De esta forma las proteínas DELLA son degradadas por el proteasoma 26S y así se libera la represión sobre la transcripción de los genes dianas (Locascio *et al*, 2013a).

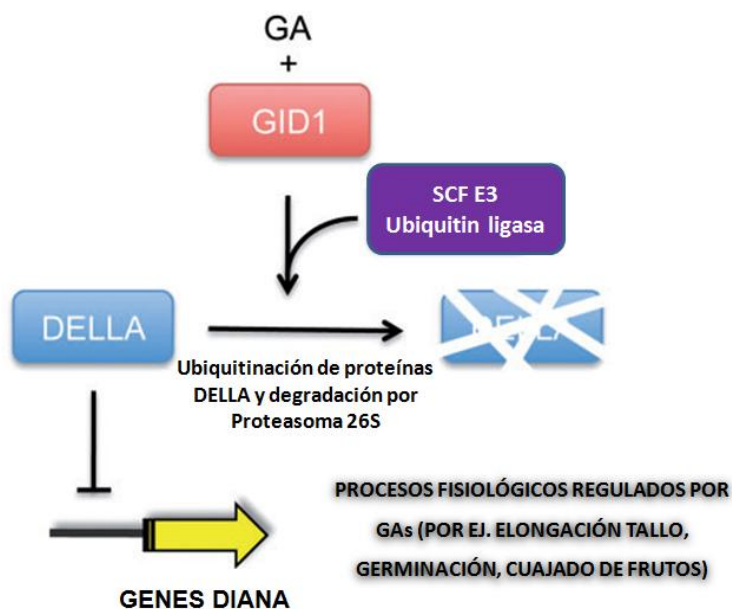


Figura I.4. Modelo de percepción y señalización de GAs (Locascio *et al*, 2013a). La unión de GAs activas al receptor *GID1* induce la adición de cadenas de poliubiquitina a la proteína DELLA catalizado por el complejo SCF E3 Ubiquitin ligasa. La ubiquitinación a su vez induce la degradación de la proteína DELLA por el proteasoma 26S y como consecuencia se induce la transcripción de los genes diana y la activación de las respuestas fisiológicas mediadas por GAs.

5.1 El receptor de GAs: *GID1*

El receptor *GID1* (Gibberellin Insensitive Dwarf-1) se identificó por primera vez en arroz (Ueguchi-Tanaka *et al*, 2005). Es un receptor soluble que se localiza en el núcleo de las células y presenta una alta homología de secuencia con proteínas humanas de tipo lipasas sensibles a hormonas (HSL: Hormone-Sensitive Lipases) (Ueguchi-Tanaka *et al*, 2005). El estudio de la estructura del receptor *GID1* reveló que éste tiene un bolsillo (traducido del inglés “pocket”) de unión a GAs y una extensión flexible de 62 residuos aminoacídicos en su extremo N-terminal (Murase *et al*, 2008; Shimada *et al*, 2008). Las GAs activas poseen un grupo β -hidroxilo en el C-3, un grupo carboxilo (-COOH) en el C-6 y forman una lactona entre los carbonos C-4 y C-10 (Figura I.1) (Yamaguchi, 2008). Estos residuos son necesarios para una adecuada unión de las

GAs a su receptor *GID1* ya que interactúan directamente con aminoácidos del bolsillo de unión a GAs del receptor y tres moléculas de agua, formando enlaces por puentes de hidrógeno (Murase *et al*, 2008; Shimada *et al*, 2008). Es conocido que la adición de un grupo hidroxilo en el C-2 de las GAs activas provoca pérdida de la actividad biológica (Yamaguchi, 2008). Esto puede deberse a que el grupo –OH en el C-2 causa interferencia estérica con el residuo Tyr 31 del receptor y como consecuencia ocasiona una disminución significativa en la afinidad de unión de las GAs a *GID1* (Murase *et al*, 2008; Shimada *et al*, 2008).

Una vez que la GA ha quedado anclada al bolsillo de unión a *GID1* se produce un cambio conformacional en el receptor. La extensión de 62 aminoácidos del extremo N-terminal del receptor funciona como una tapa y “se cierra” sobre el bolsillo de unión a GAs cubriéndolo (Murase *et al*, 2008; Shimada *et al*, 2008). Una vez cerrado este bolsillo la superficie superior de la tapa de *GID1* se une a la proteína DELLA y se forma el complejo GA-*GID1*-DELLA. La proteína DELLA no interactúa directamente con las GAs sino que éstas actúan como activadores alostéricos de *GID1* provocando con su unión al receptor cambios conformacionales en la estructura de *GID1* que favorecen la unión *GID1*-DELLA (Murase *et al*, 2008; Shimada *et al*, 2008; Hedden, 2008).

En arroz existe un único gen que codifica para *GID1* (Ueguchi-Tanaka *et al*, 2005) y en *Arabidopsis thaliana* existen tres parálogos (*GID1a*, *GID1b* y *GID1c*) (Griffiths *et al*, 2006; Nakajima *et al*, 2006; Willige *et al*, 2007). En el genoma de tomate aparecen tres secuencias con alta similitud al receptor *GID1* (*SIGID1-like* [Gene ID: 100736493]; *SIGID1B-like* [Gene ID: 101253192]; *SIGID1C-like* [Gene ID: 101253625]).

5.2 Proteínas DELLA

Las proteínas DELLA son consideradas reguladores negativos de la ruta de señalización de GAs puesto que en ausencia de GAs mantienen la ruta de señalización reprimida y en presencia de GAs se induce su degradación y por consiguiente se activa la ruta de señalización (Locascio *et al*, 2013a). Las proteínas DELLA constituyen un subgrupo de proteínas específicas de plantas que pertenecen a la familia GRAS (Locascio *et al*, 2013a). El nombre DELLA se debe a una secuencia de aminoácidos, altamente conservada, en su región N-terminal: Asp-Glu-Leu-Leu-Ala (DELLA) (Figura I.5) (Davière y Achard, 2013; Locascio *et al*, 2013a).

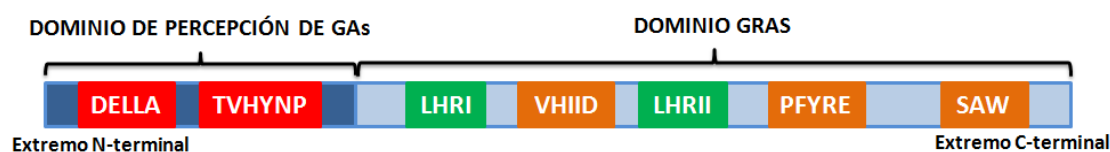


Figura I.5. Representación esquemática de estructura de proteína DELLA (Davière y Achard, 2013).

Las proteínas DELLA también presentan otros dominios altamente conservados y que son muy importantes para su interacción con el receptor *GID1*, el complejo SCF E3 Ubiquitin ligasa y también factores de transcripción (Davière y Achard, 2013). Las regiones TVHYNP y DELLA situadas en el extremo N-terminal, son claves para la unión a la “tapa” del receptor *GID1* (Willige *et al*, 2007). Las regiones VHIID y LHRII, situadas en el dominio GRAS son necesarias para la interacción con el complejo SCF E3 Ubiquitin Ligasa (Hirano *et al*, 2010). En *Arabidopsis thaliana* existen cinco genes que codifican para proteínas DELLA: *GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2* and *RGL3* (Peng *et al*, 1997; Silverstone *et al*, 1998; Sánchez-Fernández *et al*, 1998; Lee *et al*, 2002; Wen y Chang, 2002). En arroz y tomate existe solamente una proteína DELLA, en el caso de arroz ésta se llama *SLR1* (Ikeda *et al*, 2001) y en tomate se llama *PROCERA* (Martí *et al*, 2007; Bassel *et al*, 2008; Jasinski *et al*, 2008). En el mutante *procera* de tomate la proteína DELLA presenta un cambio puntual de un aminoácido de la región VHIID del dominio GRAS lo cual da lugar a una proteína DELLA inactiva (Bassel *et al*, 2008; Jasinski *et al*, 2008). Esto tiene como consecuencia una activación constitutiva de la respuesta a GAs y produce efectos fenotípicos similares a la sobre-producción de GAs como aumento en la altura de la planta, adelanto en la germinación y partenocarpia (Martí *et al*, 2007; Bassel *et al*, 2008; Carrera *et al*, 2012).

5.3 Complejo SCF E3-Ubiquitin Ligasa

El complejo SCF E3 ubiquitin ligasa está compuesto por cuatro subunidades: *CUL1* (Cullin 1), *SKP1* (Supresor of Kinetochores Protein 1), *RBX1* (RING-BOX1) y una proteína de tipo F-box (Figura I.6). El núcleo del complejo es SCF es *CUL1* que se une por su extremo N-terminal a *SKP1* y por su C-extremo terminal a *RBX1* y a su vez *SKP1* se une al extremo N-terminal de la proteína F-box (Lechner *et al*, 2006; Wang y Deng, 2011).

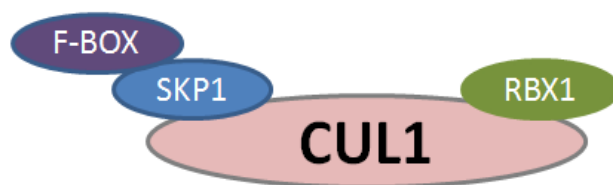


Figura I.6. Representación esquemática de complejo SCF E3 Ubiquitin Ligasa (Wang y Deng, 2011).

La ubiquitina es una pequeña proteína de 76 aminoácidos con una secuencia altamente conservada en eucariotas. Esta proteína se une a residuos de lisinas de otras proteínas celulares y esto funciona como una señal para dirigir la degradación de la proteína marcada por el proteasoma 26S (Kelley y Estelle, 2012). La ubiquitinación ocurre en tres pasos catalizados por tres tipos de enzimas diferentes: E1 (enzima activante de ubiquitina); E2 (enzima conjugador de ubiquitina) y E3 (ubiquitina ligasa) (Wang y Deng, 2011). Primero E1 hidroliza una molécula de ATP para formar un enlace tioéster con una glicina del extremo C-terminal de la ubiquitina y

la transfiere a un residuo cisteinil de E2. Finalmente E2 conjugado con ubiquitina se une al complejo E3 por interacción con RBX1 y el complejo E3 se encarga de transferir la ubiquitina a la proteína diana (Wang y Deng, 2011).

Las proteínas F-box juegan un papel crucial en el proceso de ubiquitinación de las proteínas DELLA puesto que son las que median la unión del complejo SCF E3 a las proteínas DELLA. Esta interacción se da entre los motivos GGF y LSL del extremo C-terminal de la proteína F-box y los dominios VHIID y LHRII de las proteínas DELLA (Davière y Achard, 2013).

En *Arabidopsis* se han descrito dos proteínas F-box implicadas en la degradación de las proteínas DELLA: SLEEPY1 (SLY1) (McGinnis *et al*, 2003; Dill *et al*, 2004) y SNEEZY (SNE) (Strader *et al*, 2004). En arroz hasta la fecha solo se ha identificado una proteína F-box llamada GID2 (Gomi *et al*, 2004). En el genoma de tomate aparecen dos secuencias con alta similitud a la proteína F-box GID2 de arroz (F-box protein GID2-like [Gene ID: 101243703]) y la SNE de *Arabidopsis* (F-box protein SNE-like [Gene ID: 101262934]).

6. Homeostasis del contenido de GAs activas

Las GAs controlan diversos procesos tanto del desarrollo vegetativo como reproductivo de la planta. La homeostasis de GAs se mantiene por mecanismos de retroalimentación que regulan la transcripción de los genes que codifican para los enzimas 2ODDs (Figura I.7). Esta retroalimentación es negativa en el caso de los genes biosintéticos (*GA20ox* y *GA3ox*) y positiva en el caso de los genes catabólicos (*GA2ox*) (Frigerio *et al*, 2006; Hedden y Thomas, 2012). Es decir, un aumento en el nivel de GAs reprimiría la expresión de los genes *GA20ox* y *GA3ox* e induciría la expresión de los genes *GA2ox*.

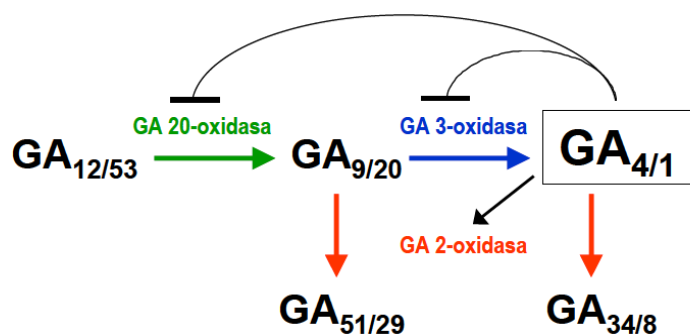


Figura I.7. Esquema de la regulación por retroalimentación negativa de genes de biosíntesis (GA 20-oxidasa, GA 3-oxidasa) y retroalimentación positiva de genes de catabolismo (GA 2-oxidasa) de GAs (Serrani, 2008).

Existen algunas excepciones como por ejemplo el gen *GA3ox2* cuya expresión, en semillas de *Arabidopsis thaliana*, no se regula por mecanismos de retroalimentación (Yamaguchi *et al*, 1998). En particular, en el caso de los enzimas *GA2ox* en tabaco, este mecanismo es dependiente de la dosis de GAs. Los genes *NtGA2ox3* y *NtGA2ox5* se activan a bajas concentraciones de GAs mientras que el gen *NtGA2ox1* se activa a altas concentraciones de GAs (Gallego-Giraldo *et al*, 2008).

7. Inhibidores del metabolismo de GAs

Se conocen 4 grupos de compuestos inhibidores de la biosíntesis de GAs y cada uno de ellos actúa a diferentes niveles de la ruta metabólica. Los compuestos tipo “onium”, compuestos que contienen un grupo N-heterocíclico, compuestos que mimetizan la estructura del ácido 2-oxoglutámico y 16, 17-dihidro-GAs. Algunos de estos compuestos se emplean de forma comercial como retardantes del crecimiento (Rademacher, 2000). Los compuestos tipo “onium” poseen un grupo amonio, fosfonio o sulfonio cargado positivamente que bloquea la biosíntesis de GAs directamente antes del *ent*-kaureno. Dentro de este grupo podemos citar el AMO-1618 que actúa inhibiendo la actividad de los enzimas CPS y KS (Rademacher, 2000). En el segundo grupo encontramos compuestos como el paclobutrazol, uniconazol, ancimidol y flurprimidol. Estos compuestos actúan inhibiendo las monooxigenasas que catalizan los pasos de *ent*-kaureno a ácido *ent*-kaurenoico (Rademacher, 2000). Dentro del tercer grupo de compuestos podemos mencionar la prohexadiona cálcica y el compuesto sintético LAB 198999. Actúan inhibiendo los pasos de biosíntesis que involucran 2ODDs puesto que presentan similitud estructural con el ácido 2-oxoglutámico, que actúa como co-sustrato de estos enzimas (Rademacher, 2000). Las 16, 17-dihidro-GAs representan el grupo más recientemente descrito como retardantes del crecimiento. La mayoría son derivados de la GA₅ y se ha descrito que reducen la elongación del tallo en *Lolium temulentum* y otras gramíneas. Actúan inhibiendo los enzimas 2ODDs de la ruta de biosíntesis (Rademacher, 2000).

8. Procesos fisiológicos controlados por GAs

8.1. Desarrollo vegetativo

Las GAs actúan como reguladores de diversos procesos del desarrollo vegetativo las plantas, tales como la germinación de las semillas, la elongación de hipocotilos y tallos, la expansión de las hojas y el desarrollo de las raíces (Thomas *et al*, 2005; Yamaguchi, 2008; Hedden y Thomas, 2012). Uno de los efectos fenotípicos más característico de las GAs es la estimulación del crecimiento del tallo, induciendo la elongación de los entrenudos de forma que niveles altos de GAs están asociados con plantas altas y bajos niveles con enanismo (Busov *et al*, 2003).

Las GAs promueven el crecimiento de varios órganos vegetativos a través de la división y expansión celular, siendo este último proceso el que mayoritariamente contribuye al incremento en la altura de la planta (Claeys *et al*, 2013). Las GAs promueven la división celular estimulando las transiciones de la fase G1 a la fase S y de la fase G2 a la fase M durante la elongación del tallo de arroz inducida por GAs (Kende *et al*, 1998). Estas transiciones del ciclo celular son reguladas por la acción de los complejos de proteínas ciclina (CYC)/quinasa dependiente de ciclina (CDK), quienes a su vez pueden ser regulados negativamente por otras proteínas, pertenecientes a la familia SIM (SIAMESE) llamadas CKI. Estas proteínas

interactúan con la subunidad D de CYC y la subunidad A de CDK (Inzé, 2005). Las GAs inducen la expresión de ciclinas, acelerando el ciclo celular en arroz (Sauter *et al*, 1995; Wang *et al*, 2013a). También se ha propuesto que, en ausencia de GAs, las proteínas DELLA promueven la acumulación de las proteínas CKI manteniendo detenido el ciclo celular y que en presencia de GAs las proteínas DELLA son degradadas, lo cual permite la progresión del ciclo celular (Achard *et al*, 2009). Las GAs también controlan la expansión celular regulando la orientación de los microtúbulos del citoesqueleto también a través de las proteínas DELLA. Se ha observado que en ausencia de GAs las proteínas DELLA se unen al complejo de las prefoldinas (PFD), que son unas chaperonas necesarias para la correcta formación de los microtúbulos de actina, y las mantienen dentro del núcleo. En presencia de GAs se degradan las proteínas DELLA y así quedan libres las PFD que van al citoplasma donde se forman los dímeros de tubulina que son las unidades estructurales del citoesqueleto (Locascio *et al*, 2013b). Además, las GAs también promueven la relajación de la pared celular favoreciendo la entrada de agua a la célula y por tanto incrementando su tamaño, mediante la inducción de enzimas de tipo expansinas, xiloglucan endotransglucosilasas y xiloglucan endohidrolasas (Cosgrove *et al*, 1989; Lee y Kende, 2002; Jan *et al*, 2004; Ribeiro *et al*, 2012; Park *et al*, 2013)

Las GAs también tienen un papel estimulador en la germinación de las semillas. Se conoce que mutantes deficientes en GAs como los mutantes *gal* de *Arabidopsis* o *gib-1* tomate son incapaces de germinar, salvo si son tratados exógenamente con GAs (Koornneef y Van der Veen, 1980, Koornneef *et al*, 1990). Se ha postulado que las GAs podrían estimular la germinación induciendo la debilitación de la pared del endospermo de la semilla permitiendo de esta forma la salida de la radícula (Groot y Karssen, 1987; Groot *et al*, 1988). La pared del endospermo en semillas de tomate es rígida y está compuesta principalmente por galactomananos (Groot *et al*, 1988). Se ha observado la inducción de varios genes que codifican para enzimas, que podrían participar en la modificación de la pared del endospermo, de tipo endo- β -manasas (*MAN2*) (Nonogaki *et al*, 2000), xiloglucano endotransglucosilasa (*XET4*) (Chen *et al*, 2002) y expansinas (*EXPA4*) (Chen y Bradford, 2000). La expresión de estos genes parece estar regulada por GAs, se ha observado que no se expresan en las semillas del mutante deficiente de GAs *gib-1*, pero si a estas semillas se les suministra de forma exógena GAs la expresión de estos genes se induce (Nonogaki *et al*, 2000; Chen *et al*, 2002; Chen y Bradford, 2000; Martínez-Andújar *et al*, 2012).

Además las GAs también tienen efecto positivo sobre el crecimiento de las raíces. Se ha observado que las raíces de los mutantes deficientes en GAs, son cortas, como en el caso del mutante *na* en guisante (Yaxley *et al*, 2001) o el mutante *gal-3* en *Arabidopsis* (Fu y Harberd, 2003). La longitud de dichas raíces se restaura con aplicaciones exógenas de GAs, en combinación con la mutación *slender* (*sln*; mutante que tiene bloqueado el catabolismo de GAs)

en guisante (Yaxley *et al*, 2001). Resultados recientes sugieren que las GAs regulan el crecimiento de las raíces promoviendo la proliferación celular, aumentando el número de células meristemáticas en la raíz, lo cual acelera el crecimiento de las mismas (Úbeda-Thomas *et al*, 2009).

8.2. Desarrollo reproductivo

Como parte esencial del ciclo de vida de una planta ésta además de crecer y nutrirse necesita reproducirse. El éxito reproductivo de una planta depende, de que la floración y el correcto cuajado y desarrollo de los frutos tengan lugar en el momento más adecuado del desarrollo y cuando las condiciones ambientales sean favorables. Primero ocurre la transición de la fase juvenil o de crecimiento vegetativo a la fase adulta, en la cual la planta adquiere capacidad reproductiva. Esta transición, también llamada transición floral, involucra el cambio de identidad del meristemo apical el cuál cesa de producir hojas y en su lugar comienza a formar flores (Poethig, 2003; Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009). En la fase juvenil o de desarrollo vegetativo la planta es incapaz de florecer como consecuencia de la incompetencia o la falta de capacidad de respuesta de los meristemas a las señales inductoras de la floración. El estímulo floral solo es percibido cuando las plantas están en la fase adulta y como consecuencia se produce el inicio del desarrollo reproductivo (Poethig, 2003; Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009). Sobre la transición floral influyen varios factores exógenos como el fotoperíodo y la temperatura y endógenos como la concentración de GAs activas (Song *et al*, 2013). Las GAs son necesarias para regular la transición floral, aunque el efecto que ejercen depende de la especie vegetal (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009). En *Arabidopsis thaliana* (Blázquez *et al*, 1998) las GAs inducen la floración mientras que en otras especies como uva (Boss y Thomas, 2002) la retrasan. En tomate y tabaco las GAs son necesarias para la floración ya que mutantes deficientes de GAs no son capaces de florecer a menos que se les suministre GAs (Koornneef *et al*, 1990; Gallego-Giraldo *et al*, 2007) de forma exógena. En el caso de tomate, el aumento de los niveles de GAs incrementa el número de unidades simpodiales en el tallo ocasionando un retraso en la floración (Lozano *et al*, 2009; Carrera *et al*, 2012; García-Hurtado *et al*, 2012).

Las GAs también son necesarias para el adecuado desarrollo de los órganos florales (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009). Las anteras son sitios de síntesis activa de GAs como lo demuestra la expresión localizada de genes de biosíntesis GA20ox y GA3ox en el tapetum en varias especies como tomate (Rebers *et al*, 1999), petunia (*Petunia hybrida*) (Weiss *et al*, 1995) y *Arabidopsis* (Hu *et al*, 2008). En varias especies se ha reportado que la deficiencia o no percepción de GAs causa un desarrollo anormal en diferentes puntos del desarrollo de las anteras y por tanto androesterilidad. En petunia (*Petunia hybrida*) el tratamiento con el inhibidor de biosíntesis de GAs paclobutrazol (PCB) bloquea el desarrollo de las anteras

después de la meiosis. Como consecuencia, no se alcanza la maduración del polen y por tanto no se obtiene polen viable (Izhaki *et al*, 2002). En el mutante *gal-3* (deficiente en enzima CPS) de *Arabidopsis* el desarrollo de la antera se detiene luego de la meiosis y antes de la mitosis del polen (Koornneef y van der Veen, 1980; Cheng *et al*, 2004). Mutaciones en los genes que codifican para enzimas de biosíntesis y catabolismo GA20ox, GA3ox y GA2ox en *Arabidopsis* afectan la elongación de los filamentos de la antera e interrumpen el crecimiento de la misma en luego de la formación de tétradas por meiosis de las células madre del polen, impidiendo la deshincencia (Hu *et al*, 2008; Rieu *et al*, 2008; Plackett *et al*, 2011). En los mutantes *gib-1* y *gib-2* de tomate y en plantas transgénicas de tomate, donde se suprime la expresión del gen del enzima de biosíntesis GA20ox1, el desarrollo de las anteras se encuentra detenido ya que no se completa el proceso de meiosis de las células madre del polen (Nester y Zeevaart, 1988; Jacobsen y Olszewki, 1991; Olimpieri *et al*, 2011). En arroz la pérdida de función del receptor GID1 provoca la parada del desarrollo de la antera antes de la meiosis (Aya *et al*, 2009).

Las GAs también son necesarias para el crecimiento del tubo polínico y la germinación del polen (Singh *et al*, 2002; Chhun *et al*, 2007). Por ejemplo, la sobreexpresión de un gen de catabolismo de GAs de guisante (*PsGA2ox2*) en *Arabidopsis*, produce plantas transgénicas con menor crecimiento del tubo polínico (Singh *et al*, 2002) y este defecto puede ser rescatado parcialmente por la aplicación exógena de GAs o por combinaciones con mutaciones en la sensibilidad de GAs tales como *sly-5*, *gar2-1*, *rga-2* y *rga-2/gai-d5* (Swain *et al*, 2004). En arroz, los mutantes de biosíntesis como el *D35* (deficiencia en enzima de biosíntesis KO) muestran una disminución en el desarrollo del polen y la elongación del tubo polínico mientras que los mutantes de señalización solamente muestran defectos en el desarrollo del polen (Chhun *et al*, 2007).

Otro aspecto importante en el desarrollo reproductivo de la planta es la formación y desarrollo de los frutos y en el cual las GAs desempeñan un papel crucial (Pharis y King, 1985; Gillaspay *et al*, 1993). Varias evidencias experimentales demuestran la importancia de las GAs en el cuajado y desarrollo del fruto en tomate:

1. El contenido de GAs activas se incrementa en los ovarios después de la polinización (Bohner *et al*, 1988; Koshioka *et al*, 1994; Serrani *et al*, 2007a).
2. La aplicación exógena de GAs a ovarios emasculados no polinizados induce el desarrollo partenocárpico del fruto (Alabadí *et al*, 1996, Fos *et al*, 2000, 2001; Serrani *et al*, 2007b).

3. La aplicación de un inhibidor de la síntesis de GAs (paclobutrazol) a ovarios polinizados inhibe su desarrollo y este efecto puede ser revertido por la aplicación de exógena de GA₃ (Fos *et al*, 2000, 2001).
4. La pérdida de función de la proteína DELLA, un represor de la ruta de señalización por GAs, induce la producción de frutos partenocárpicos (Martí *et al*, 2007; Carrera *et al*, 2012).
5. Plantas de tomate transgénicas que sobre-expresan el gen de biosíntesis *CcGA20ox1* producen un mayor número de frutos partenocárpicos que las plantas silvestres (García-Hurtado *et al*, 2012).
6. Los ovarios de plantas transgénicas, donde se suprime la expresión del enzima de biosíntesis *SIGA20ox1*, no se desarrollan a menos que sean polinizados con polen silvestre (Olimpieri *et al*, 2011).

En ovarios del mutante *procera*, donde se encuentra constitutivamente activada la respuesta a GAs, la expresión de enzimas relacionados con la división (ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas), y la expansión celular (expansinas y xiloglucan transferasas) se induce significativamente luego de la anthesis (Carrera *et al*, 2012). Estos resultados sugieren que las GAs promueven el desarrollo del fruto de tomate promoviendo tanto la división como la expansión celular.

9. El RNA de interferencia como herramienta para estudios genéticos funcionales

En la actualidad, gracias a los avances en las técnicas de secuenciación, ha sido posible conocer el genoma completo de varias especies vegetales como *Arabidopsis*, arroz, tomate, patata, café, maíz, melón y fresa. El conocimiento de las secuencias de DNA abre la puerta al siguiente reto que es dilucidar la función biológica de los diversos genes, lo cual resulta de vital importancia y aplicación en proyectos de mejora biotecnológica.

Uno de los enfoques empleados para determinar la función de un gen se denomina genética reversa y consiste en eliminar la expresión del gen cuyo papel se desea conocer para observar los efectos que se producen en la planta e inferir su función. La expresión de un gen puede eliminarse usando estrategias como la mutagénesis insercional, la expresión en antisentido y la co-supresión (Waterhouse y Helliwell, 2003). La mutagénesis insercional puede realizarse por inserciones de T-DNA (Krysan *et al*, 1999) o por elementos transponibles (Speulman *et al*, 1999) y ha permitido crear colecciones de mutantes nulos de especies como *Arabidopsis thaliana* y arroz que han resultado muy útiles para la comunidad científica (Alonso *et al*, 2003;

Sallaud *et al*, 2004). Sin embargo, la aplicación de estas técnicas resulta limitada ya que no puede usarse para analizar genes duplicados. Además cuando existe redundancia génica o se trata de especies poliploides, se hace necesario generar mutantes múltiples, lo cual en ciertas especies resulta extremadamente laborioso (Waterhouse y Helliwell, 2003; Travella *et al*, 2006). La tecnología del RNA de interferencia o Silenciamiento Génico Post-Transcripcional (SGPT) en cambio, no se encuentra limitada por estos factores y ha demostrado ampliamente su efectividad y versatilidad para suprimir eficientemente la expresión de uno o varios genes en diversas especies vegetales, incluidas especies de difícil transformación (Katoch y Thakur, 2013).

La tecnología del RNA de interferencia se basa en un fenómeno natural que ocurre en las plantas como mecanismo de defensa ante virus y elementos transponibles y también como mecanismo de regulación de diversos genes endógenos (Ali *et al*, 2010). Este fenómeno se observó de forma accidental por primera vez en petunia en 1990 (Napoli *et al*, 1990), aunque se describió en detalle años más tarde en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al*, 1998) y a partir de aquí se convirtió en una herramienta de gran valor para estudios de genética funcional. El RNA de interferencia ha sido usado en un amplio número de especies para estudiar la función de genes y también se ha empleado para la modificación de caracteres de interés agronómico, ornamental y medicinal en especies tales como petunia (Muir *et al*, 2001; Kapoor *et al*, 2002), *Arabidopsis* (Dhankher *et al*, 2006), algodón (Liu *et al*, 2002), arroz (Kusaba *et al*, 2003), café (Ogita *et al*, 2003); cebolla (Eady *et al*, 2008) y tomate (Davuluri *et al*, 2005), entre otras.

El proceso de SGPT se inicia con una molécula de RNA de doble cadena (RNAdc), de longitud variable, que puede originarse a partir de la transcripción de algunas secuencias codificadas en el genoma de la planta, del genoma de un virus o puede introducirse de forma artificial (Baulcombe, 2004). En esta molécula de RNAdc una de las cadenas es igual a la secuencia del RNA mensajero del gen que se quiere silenciar (cadena sentido) y la otra cadena es complementaria (cadena antisentido). La molécula RNAdc es reconocida por unos enzimas llamadas Dicer (DCL), que son RNAasas de tipo III y que usan como sustrato RNAs bicatenarios. Las moléculas RNAdc son cortadas por los enzimas DCL en moléculas RNAdc pero más pequeñas de entre 21 y 24 nucleótidos (RNAdc^{21-24nt}). Estos RNAdc^{21-24nt} tienen una particularidad y es que tienen 2 nucleótidos libres en el extremo de cada cadena. Esta estructura característica de los RNAdc^{21-24nt} permite su reconocimiento y unión al Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA [(RISC por sus siglas en inglés (RNA-Induced Silencing Complex))]. Una vez unidos los RNAdc^{21-24nt} al RISC se degrada la cadena sentido mientras que la cadena antisentido permanece unida al RISC y lo “guía” hacia el mensajero del gen en estudio induciendo su degradación (Katoch y Thakur, 2013). El núcleo del complejo RISC son

las proteínas Argonautas (AGO). Estas proteínas pertenecen a una familia de proteínas altamente conservada tanto en plantas como animales y poseen 2 dominios llamados PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) y PIWI. El dominio PAZ es el que media la unión a los RNAdc^{21-24nt} y el dominio PIWI posee actividad RNAsa similar a el enzima RNAasaH (Song *et al*, 2004; Poulsen *et al*, 2013). Además de los enzimas DCL y AGO para el silenciamiento génico son importantes las RNA polimerasas RNA dependientes para amplificar las secuencias de RNAdc (Katoch y Thakur, 2013).

Para inducir silenciamiento génico en plantas se emplean dos estrategias mayoritariamente: las construcciones de secuencias homólogas invertidas, separadas por un intrón (tipo horquilla o shRNA) (Smith *et al*, 2000; Helliwell y Waterhouse, 2003) y los microRNA artificiales (amiRNA) (Schwab *et al*, 2006). Actualmente existen disponibles varias colecciones de vectores comerciales que permiten obtener estas construcciones a través de pasos sencillos de clonaje y además brindan un amplio rango de posibilidades de acuerdo a los intereses del estudio ya que cuentan con diferentes tipos de marcadores y promotores (Karimi *et al*, 2007; Eamens y Waterhouse, 2011; Yan *et al*, 2012; Zhou *et al*, 2013).

Las construcciones shRNA se generan a partir de secuencias clonadas en orientaciones invertidas separadas por un intrón y que al transcribirse por complementariedad generan una estructura de tipo horquilla (Smith *et al*, 2000; Helliwell y Waterhouse, 2003). El rango de longitudes de secuencia que se pueden usar en este tipo de construcciones varía desde 50pb a 1.6kb, aunque el tamaño óptimo se sitúa entre los 300-600pb puesto que fragmentos muy pequeños tienen una baja frecuencia de silenciamiento mientras que secuencias muy grandes pueden producir recombinaciones dentro de las bacterias usadas en el clonaje (Wesley *et al*, 2004). Este tipo de construcciones se ha empleado eficientemente en varias especies vegetales como *A. thaliana* (Kaur *et al*, 2006), trigo (Travella *et al*, 2006; Gil-Humanes *et al*, 2008; Gil-Humanes *et al*, 2010) y arroz (Miki *et al*, 2005; Pistón *et al*, 2010; Shigemitsu *et al*, 2012; Wang *et al*, 2013b) para inducir silenciamiento simple y múltiple. Este tipo de construcciones tiene como desventaja que el procesamiento del precursor RNAdc inicial por los enzimas DCL se realiza de forma aleatoria generándose una mezcla de varias moléculas diferentes de RNAdc^{21-24nt} a partir de la molécula RNAdc inicial lo cual incrementa el riesgo de suprimir genes no deseados (Xu *et al*, 2006). Además, en algunas ocasiones este tipo de transgenes puede ser auto silenciado (Molnar *et al*, 2009).

Los micro-RNA (miRNA) constituyen un tipo de RNAdc no codificantes de 20-24 nucleótidos. Los miRNA se originan a partir de precursores (pre-miRNA) más grandes que se forman al transcribirse moléculas de RNA no codificantes y que forman una estructura de horquilla. Los pre-miRNA son procesados por los enzimas DCL y obtiene una molécula de RNAdc

miRNA/miRNA*, donde miRNA corresponde a la cadena antisentido que se une al RISC y miRNA* es la cadena sentido (Schwab y Voinnet, 2009). Los pre-miRNA están codificados en el genoma de la planta y tienen función reguladora (Huntzinger e Izaurralde, 2011). La tecnología de los amiRNA aprovecha este mecanismo natural para generar RNAdc que silencien genes de interés. Los amiRNA son secuencias de 21 nucleótidos que no se encuentran de forma natural en la planta y que se generan al sustituir dentro de la secuencia del pre-miRNA endógeno la secuencia correspondiente al miRNA por la del amiRNA de tal forma que al ser procesado por el enzima DCL se generarán moléculas RNAdc que inducirán el silenciamiento del gen de interés (Zeng *et al*, 2002; Schwab *et al*, 2006). Los pre-miRNA más empleados son pre-miRNA319a (Schwab *et al*, 2006); pre-miRNA164b (Álvarez *et al*, 2006), pre-miRNA159a (Niu *et al*, 2006); pre-miRNA171 (Parizotto *et al*, 2004); pre-miRNA172a (Schwab *et al*, 2006) y pre-miRNA169d (Liu *et al*, 2010) de *Arabidopsis thaliana*. Estos pre-miRNA a pesar de proceder de *A.thaliana* han sido empleados con gran eficacia en otras especies como tabaco, tomate (Álvarez *et al*, 2006) y berenjena (Toppino *et al*, 2011). Los amiRNA inducen el silenciamiento de forma eficiente y poseen una ventaja sobre los shRNA ya que en este caso el corte de la DCL solo ocurre en un punto específico del precursor y solamente se origina un tipo de molécula por lo que resulta altamente específico y además el riesgo de silenciar genes no deseados resulta mínimo (Ossowski *et al*, 2008; Li *et al*, 2013).

En ambos tipos de construcciones la eficiencia del silenciamiento está relacionada principalmente con la homología de secuencia entre la secuencia inductora y la secuencia diana y con la abundancia del mensajero que se desea silenciar (Kerschen *et al*, 2004; Miki *et al*, 2005; Gil-Humanes *et al*, 2010; Shigemitsu *et al*, 2012).

10. Tomate (*Solanum lycopersicum* L)

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los frutos carnosos tipo baya más estudiados. Actualmente el tomate es una de las hortalizas más consumida a nivel mundial (FAOSTAT, <http://faostat3.fao.org/home/index.html>). Es muy apreciado por su alto valor nutricional y puede consumirse de varias formas tanto en fresco como procesado en forma de pastas, sopas, zumos o salsas (Bergougnoux, 2013). Además de su valor comercial y nutricional, el tomate también es una especie modelo debido a diversas características, algunas de las cuales no se encuentran en otras especies modelo como *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus* y arroz (*Oryza sativa* L.). Estas características son: crecimiento simpodial, formación de hojas compuestas, frutos climatéricos carnosos tipo baya, ciclo de vida relativamente corto, insensibilidad a fotoperíodo (su floración y fructificación no están influidas por el fotoperíodo), genoma relativamente pequeño (950 Mb) y facilidad para la transformación genética (Carvalho *et al*, 2011; Ranjan *et al*, 2012; Bergougnoux, 2013).

El tomate es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas. Dentro de esta familia podemos encontrar también otras especies de interés para la agricultura y de uso ornamental como patata, pimiento, berenjena, tabaco y petunia (Bergougnoux, 2013). La taxonomía aceptada para el tomate es la siguiente (Foolad, 2007):

Reino: *Plantae*

Subreino: *Traqueobinta*

Superdivisión: *Spermatophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Solanales*

Suborden: *Solanineae*

Familia: *Solanaceae*

Género: *Solanum*

Especie: *lycopersicum*

10.1 Arquitectura de la planta y desarrollo vegetativo.

El tomate es una planta perenne que se cultiva como anual, que puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. El tallo tiene 2-4 cm de diámetro en la base y está cubierto por tricomas glandulares y no glandulares que salen de la epidermis (Nuez, 2001). Las plantas de tomate presentan un patrón de crecimiento simpodial (Figura I.8A). Luego de emerger de la semilla, el meristemo apical del tallo (SAM) comienza a producir nudos vegetativos u hojas (8-12 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 antes de la inflorescencia terminal (Hoja 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. Luego se activa el siguiente MS y se vuelve a repetir el proceso a lo largo del tallo a través de sucesivos segmentos o unidades simpodiales formados por tres hojas y una inflorescencia (Atherton y Harris, 1986; Schmitz y Theres, 1999). Este tipo de crecimiento se observa en variedades como MoneyMaker, p73 y Ailsa Craig y también es denominado crecimiento indeterminado puesto que el ápice vegetativo no pierde dominancia apical y el tallo continúa creciendo. La determinación de los meristemas en tomate está regulada por el gen *Self Pruning (SP)* (Pnueli *et al*, 1998), ortólogo de los genes *Terminal Flower 1 (TFL1)* de *Arabidopsis* (Bradley *et al*, 1997) y *CENTRORADIALIS (CEN)* de *Antirrhinum* (Bradley *et al*, 1996). En *Arabidopsis* y *Antirrhinum* estos genes son responsables de mantener

el estado indeterminado del SAM y también regulan la arquitectura de la inflorescencia (Bradley *et al*, 1996; Bradley *et al*, 1997). En tomate, en cambio, la pérdida de función del gen *SP* no tiene efectos sobre la arquitectura de la inflorescencia ni sobre el segmento inicial del tallo. En mutantes *sp* se reduce el número de unidades simpodiales en el tallo y la fase vegetativa termina con la aparición de dos inflorescencias consecutivas (Figura I.8B), lo cual sugiere que el gen *SP* actúa regulando la determinación de los MS (Pnueli *et al*, 1998; Thouet *et al*, 2008). Al patrón de crecimiento de los mutantes *sp* se le conoce como determinado y se aprecia en variedades como Micro-Tom, UC-82 y Rutgers (Martí *et al*, 2006).

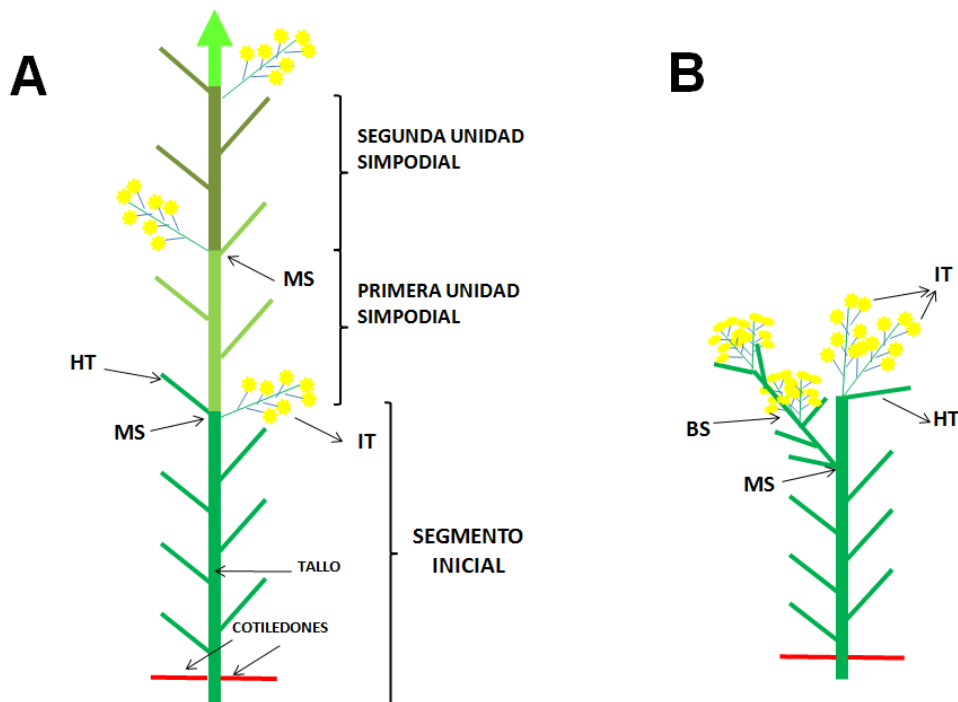


Figura I.8. Representación esquemática de arquitectura del tallo y patrón de crecimiento en tomate. A: Patrón de crecimiento simpodial indeterminado; B: Patrón de crecimiento determinado de mutantes *sp*. HT: Hoja Terminal; IT: Inflorescencia Terminal; MS: Meristemo Simpodial; BS: Brote simpodial

Las hojas del tomate son pinnado compuestas. Una hoja típica tiene un gran foliolo terminal y puede tener hasta 8 grandes foliolos laterales, que a su vez, también pueden ser compuestos. Los foliolos son usualmente peciolados y lobulados irregularmente con bordes dentados. Las hojas son de tipo dorsiventral o bifacial, y están recubiertas de pelos del mismo tipo que los del tallo. El sistema radicular está compuesto por una raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias (Nuez, 2001).

10.2 Desarrollo reproductivo

Las flores de tomate son hermafroditas y constan de cuatro verticilos: cáliz, corola, androceo y gineceo (Figura I.9). El cáliz o verticilo exterior, lo conforman los sépalos de color verde. El siguiente verticilo que es la corola está formado por pétalos de color amarillo. Las flores de

tomate poseen el mismo número de sépalos que de pétalos que oscila entre 5 y 7. El siguiente verticilo es el androceo que son los estambres (órganos masculinos de la planta) y se desarrollan fusionados formando un cono que envuelve el cuarto verticilo que es el gineceo (órganos femeninos). El gineceo en tomate está formado por la fusión de al menos dos carpelos y en él pueden distinguirse tres estructuras: estigma, estilo y ovario, dentro del cual están contenidos los óvulos. El ovario puede ser bilocular o plurilocular y es la estructura que se desarrollará como fruto después de la fertilización (Gasser y Robinson-Beers, 1993; Lozano *et al*, 2009). Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso y se unen al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión, distinguible por un engrosamiento con un pequeño surco originado por una reducción del espesor del córtex.

El fruto es una baya, generalmente de color rojo. Puede tener forma globular, ovoide o aplastada y puede tener dos o más lóculos. El tamaño y forma del fruto son caracteres heredables. El tamaño del fruto está controlado por aproximadamente 30 QTLs (Quantitative Trait Loci). El gen *Fw2.2* se ha identificado como el responsable de casi el 30% las variaciones en el tamaño del fruto y codifica para un regulador negativo del ciclo celular que inhibe el proceso de mitosis (Cong y Tanksley, 2006). Para la forma del fruto se conocen actualmente cuatro genes: *SUN* y *OVATE*, que controlan la forma elongada del fruto, *FASCIATED*, asociado a frutos de forma aplastada y *LOCULE NUMBER*, que regula el número de lóculos del fruto (Seymour *et al*, 2013).

El fruto de tomate está constituido por: pericarpo, tejido locular, placenta y semillas (Figura I.9). El pericarpo se desarrolla a partir de la pared del ovario y está formado por tres capas: endocarpo, mesocarpo y exocarpo. Además, en el pericarpo encontramos las paredes radiales o septos que separan los lóculos y la pared interna o columnela. El endocarpo o capa más interna está constituido por una capa celular que delimita los lóculos. Los lóculos son cavidades en el interior del fruto, llenas de tejido locular y es donde están contenidas las semillas. El tejido locular colinda con la placenta puesto que surge a partir de ésta. El mesocarpo está compuesto por tejido de tipo parenquimático y presenta varios haces vasculares distribuidos de forma radial a lo largo del pericarpo. Por último tenemos la capa más externa que es el exocarpo que está compuesto por una epidermis que no posee estomas, y tres o cuatro capas subepidérmicas de tipo colenquimático (Gillaspy *et al*, 1993).

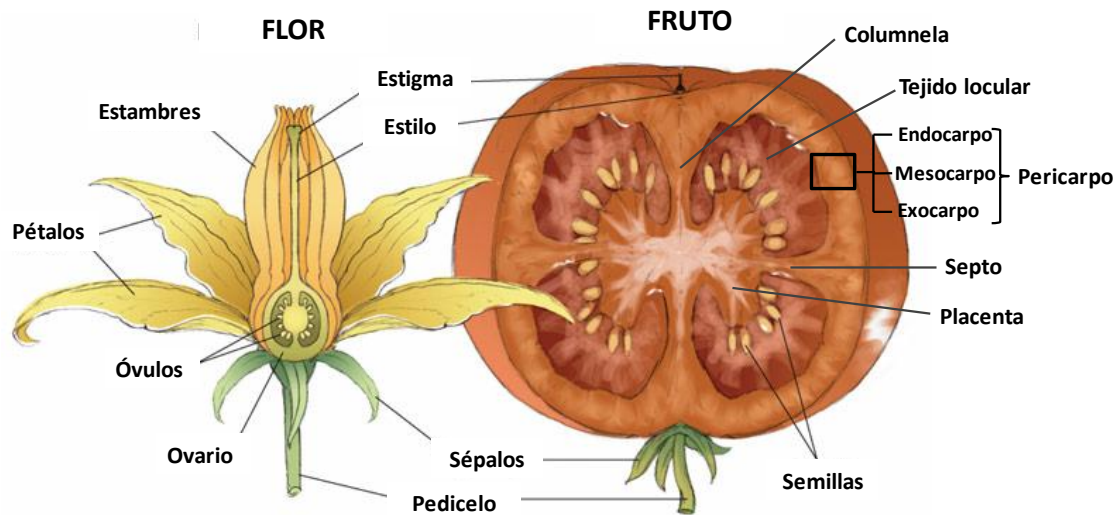


Figura I.9. Morfología de flor y fruto de tomate (adaptado de www.biographixmedia.com/biology/tomato-flower-fruit.html). A la izquierda se representa una flor de tomate completamente desarrollada, al momento de la antesis. A la derecha se representa un fruto maduro de tomate. Se observan el pericarpo formado a su vez por, de adentro hacia afuera, endocarpo, mesocarpo y exocarpo, los septos, las semillas en contacto con la placenta, rodeadas de tejido locular, y en el eje central se encuentra la columela.

Los óvulos son las estructuras precursoras de las semillas y están formados por tres estructuras básicas: la nucela, los integumentos (uno interno y otro externo) y el funículo. La nucela se deriva de la porción apical del primordio del óvulo y es la encargada de producir el megasporocito, que luego de pasar por procesos de división celular por meiosis dará origen a las megasporas. Los integumentos envuelven la nucela y el funículo conecta los óvulos a la placenta. Las semillas se originan a partir de los óvulos fertilizados y tienen forma lenticular. Están formadas por el embrión, el endospermo y la testa o cubierta seminal. El embrión se forma como resultado de la unión de la megaspora de la nucela (célula haploide femenina) y la célula masculina que llega a través del tubo polínico. El endospermo sirve como fuente de nutrientes para el embrión en desarrollo. Los integumentos del óvulo tienen función protectora ya que luego de la fertilización crecen englobando el embrión y finalmente forman la testa o cubierta seminal que es la capa más externa de una semilla (Reiser y Fischer, 1993; Linkies *et al*, 2010). En las semillas de tomate la testa es una capa rígida compuesta principalmente por β -galactomananos (Groot *et al*, 1988; Chen y Bradford, 2000).

10.2.1 Fructificación.

Los frutos son muy importantes para garantizar el éxito reproductivo de las plantas puesto que primero funcionan como receptáculo para el proceso de maduración de las semillas protegiéndolas del ataque de depredadores y de condiciones ambientales desfavorables y posteriormente favorecen la dispersión de las semillas (Gillaspy *et al*, 1993). La fructificación es el proceso de formación del fruto y es un proceso bastante complejo que puede dividirse en tres grandes etapas: polinización, fertilización y crecimiento del fruto.

10.2.1.1 Polinización.

La polinización es la primera etapa en la formación del fruto y es el proceso de transferencia del gametofito masculino (polen) desde el órgano masculino (antera) al órgano femenino (estigma) (Dumas y Rogowsky, 2008). La flor de tomate es autógama, lo cual quiere decir que se autopoliniza. El estilo de las flores de tomate comienza a emerger desde etapas tempranas del desarrollo floral (brotes florales de aproximadamente 2mm) y se alarga rápidamente, empujando el estigma a través del cono estaminal, hasta alcanzar una longitud de aproximadamente 7mm (Brukhin *et al*, 2003; Nuez, 2001). Al mismo tiempo también se desarrollan y maduran los granos de polen en las anteras a partir de las células madre del polen (CMP) por procesos de meiosis. Las CMP se producen en el tejido esporógeno de la antera y se transforman en tétradas de microsporas haploides por dos divisiones meióticas consecutivas (Mascarenhas, 1989). Cuando la flor alcanza un tamaño aproximado de 10mm se produce la antesis y las anteras dehiscen liberando el polen maduro y de esta forma permiten la caída de los granos de polen en el estigma. La polinización generalmente se produce en el momento de la antesis, aunque el estigma permanece receptivo desde días antes hasta dos días después de la antesis (Brukhin *et al*, 2003; Nuez, 2001).

La transferencia de los granos de polen al estigma depende de factores exógenos como la temperatura y de factores endógenos como la longitud del estilo (Lozano *et al*, 1998; Nuez, 2001; Sato *et al*, 2004). La temperatura óptima para que se produzca exitosamente la polinización debe estar entre 17°C y 24°C puesto que fuera de ese rango se producen alteraciones en el número e identidad de los órganos florales así como fallos en la liberación de los granos de polen; los cuales imposibilitan la polinización (Lozano *et al*, 1998; Sato *et al*, 2004). También es muy importante la longitud del estilo, para que se produzca la polinización el estigma debe estar situado a la altura del cono de las anteras o por debajo de él (Nuez, 2001). Actualmente se conoce un QTL en el cromosoma 2 de tomate denominado *stigma exertion 2.1* o *se2.1*, formado por al menos cinco genes: tres de ellos controlan la longitud del estambre (*stamen2.1*, *stamen2.2* y *stamen2.3*) uno controla la longitud del estilo (*style2.1*) y otro condiciona la dehiscencia de las anteras (*dehiscence2.1*) (Chen y Tanksley, 2004; Chen *et al*, 2007).

10.2.1.2 Fertilización.

La fertilización o fecundación es el siguiente paso en el proceso de fructificación y comprende la unión de los gametos masculinos y femeninos para formar el embrión (Figura I.10). El saco embrionario (gametofito femenino) en las angiospermas consiste en siete células y cuatro tipos celulares diferentes: tres células antípodas, dos células sinérgidas, una ovocélula o cigoto y un núcleo polar (Figura I.10C). Las células que forman el gametofito femenino están organizadas con un patrón y una disposición característica. Las tres células que se sitúan en el extremo

apical son la ovocélula o cigoto y está flanqueada por las dos sinérgidas. En el extremo opuesto se sitúan las células antípodas y en el centro, ocupando casi todo el volumen del saco embrionario, se sitúa el núcleo polar (Yadegari y Drews, 2004). El gametofito masculino está compuesto por dos núcleos: un núcleo vegetativo, encargado de formar el tubo polínico y un núcleo generativo, que formará las células espermáticas o gametos masculinos. Una vez depositados los granos de polen en el estigma éstos se hidratan y germinan creando el tubo polínico a partir del núcleo vegetativo. El tubo polínico penetra en el canal de estilo y se alarga hasta llegar y penetrar en el en el óvulo a través del micrópilo, que es una pequeña apertura en la base apical de los óvulos (Dumas y Rogowsky, 2008). Mientras esto ocurre, la célula generativa que está dentro del grano de polen, sufre un proceso de división que da origen a dos células espermáticas haploides. Una vez formado el tubo polínico, las dos células espermáticas descienden por el mismo tubo y penetran en el saco embrionario a través de una de las dos sinérgidas, teniendo lugar la rotura del tubo polínico y la liberación de las dos células espermáticas. Tras la migración de las células espermáticas se produce el proceso de la doble fecundación. Una célula espermática (n) se une con la ovocélula también haploide (n) para formar el cigoto diploide ($2n$) a partir del cual se desarrollará el embrión y la otra célula espermática se une a las células del núcleo polar para formar el endospermo que servirá como reserva de nutrientes para el embrión (Berger *et al*, 2006).

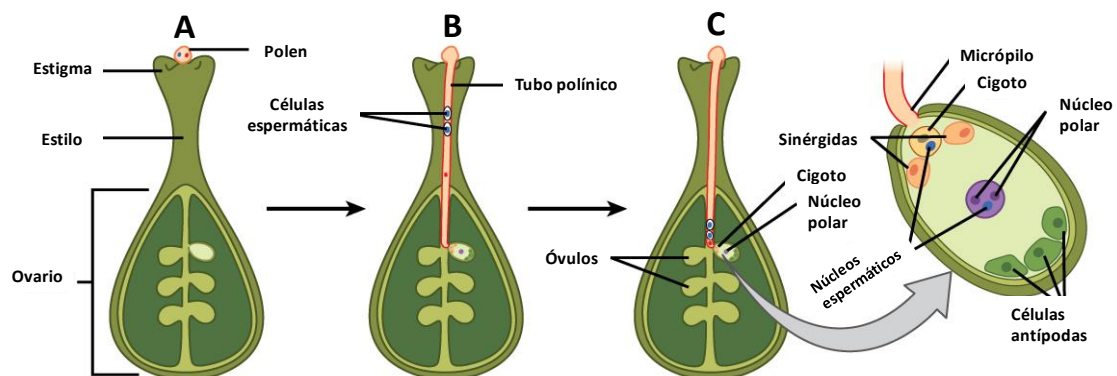


Figura I.10. Representación esquemática del proceso de fertilización de ovarios de tomate. A: El grano de polen que contiene dos núcleos (vegetativo y generativo) se adhiere al estigma. B: Se forma el tubo polínico a partir del núcleo vegetativo y penetra en el canal del estilo hasta llegar a los óvulos. El núcleo generativo se divide para formar dos células espermáticas. C: El tubo polínico penetra a través del micrópilo y una de las células espermáticas se une con el cigoto haploide (n) para formar el cigoto diploide o embrión ($2n$). La otra célula espermática se une con las células del núcleo polar para formar el endospermo que se convertirá en fuente de nutrientes para el embrión.

El número de óvulos fecundados, y por consiguiente el número de semillas, dependen del número de células espermáticas que alcancen los óvulos (Ho y Hewitt, 1986). Al igual que la polinización, la fecundación también depende de factores ambientales como la temperatura. La exposición a temperaturas superiores a los 24°C causa fallos en el proceso de germinación del polen impidiendo la formación del tubo polínico y por tanto la fecundación (Sato *et al*, 2004).

10.2.1.3 Crecimiento del fruto.

Una vez que tienen lugar la polinización y fertilización de los óvulos, se inicia el crecimiento del fruto que dura aproximadamente 50 días. El proceso de crecimiento del fruto de tomate puede dividirse en 4 fases: cuajado, división celular, expansión celular y maduración (Jong *et al*, 2009). El cuajado incluye los dos primeros días después de la antesis, donde no se detecta crecimiento del ovario y representa la transición de ovario a fruto (Gillaspy *et al*, 1993) (Figura I.11A). El ovario comienza a crecer a partir de la segunda fase que se inicia 2 DPA (Días Post-Antesis) y en esta fase predomina el crecimiento por división celular (Figura I.11B). Esta fase se inicia con las señales generadas por los óvulos fecundados que producen un aumento en la tasa de división celular principalmente en la pared del ovario (Gillaspy *et al*, 1993; Pabón-Mora y Litt, 2011). Alrededor de los 7-8DPA además de la división celular también comienza a notarse expansión celular (Figura I.11C), responsable en gran medida del tamaño final del fruto. La fase de división celular cesa a los 10-14DPA y a partir de aquí y hasta 24-30DPA el crecimiento del fruto está controlado por la expansión celular. Durante este tiempo la pared del ovario se ha transformado en el pericarpo, los óvulos en las semillas y se desarrolla la placenta que es un tejido gelatinoso formado por células muy vacuoladas que engloba las semillas y rellena todo el espacio interior del fruto (Jong *et al*, 2009). Al final de la etapa de expansión celular el fruto ya ha alcanzado su tamaño final por lo que solo queda la última fase que es la fase de maduración (Figura I.11D) en la cual el fruto pasa de color verde a naranja y finalmente a rojo (Pabón-Mora y Litt, 2011). Las semillas en desarrollo pueden controlar y mantener la tasa de divisiones celulares en el tejido locular y la placenta, ya que se ha observado que el número de óvulos fecundados determina la tasa inicial de crecimiento del ovario (Varga y Bruinsma, 1986). También se conoce que existe una correlación directa entre el número de semillas en desarrollo y el tamaño final del fruto (Hobson y Davies, 1970; Varga y Bruinsma, 1986).



Figura I.11. Desarrollo del fruto de tomate (Jong *et al*, 2009). (A) La primera etapa del desarrollo o cuajado comienza cuando el ovario es fertilizado. (B) Segunda etapa del desarrollo que es la etapa de división celular, que si inicia 2 días post-antesis (DPA) y se extiende hasta los 10-14 DPA. (C) Tercera etapa de expansión celular que se inicia a los 7-8 DPA y se prolonga hasta 30 DPA. (D) Luego tiene lugar la fase final que es la fase de maduración hasta la obtención de frutos maduros.

En ausencia de fertilización generalmente los ovarios de tomate no se desarrollan como frutos. Sin embargo, en algunas ocasiones el ovario puede desarrollarse sin fertilización. La partenocarpia es una vía alternativa al desarrollo normal del fruto, dependiente de fertilización, y consiste en el desarrollo del ovario sin la formación de semillas (Gillaspy *et al*, 1993). La partenocarpia puede ocurrir cuando falla la polinización, cuando ocurre la polinización pero no se produce la fertilización o cuando ocurren ambos procesos pero abortan las semillas. La producción de frutos partenocárpicos en tomate puede producirse de forma natural o puede inducirse de forma artificial (Gillaspy *et al*, 1993).

La partenocarpia natural, controlada genéticamente, podemos observarla en algunos cultivares como el cultivar ruso Severianin obtenido por Solovjeva y RP75/59, obtenida por Reimann-Philipp en Alemania (Philouze, 1983). La capacidad partenocárpica de estas plantas está controlada por dos sistemas genéticos no alélicos: *pat-2* en el cultivar Severianin (Philouze y Maisonneuve, 1978; Nuez *et al*, 1986) y *pat-3/pat-4* en RP75/59 (Nuez *et al*, 1986, Vardy *et al*, 1989). La partenocarpia natural a su vez puede ser obligada o facultativa (Ho y Hewitt, 1986). La partenocarpia obligada está asociada a la esterilidad genética y las plantas que la poseen requieren métodos vegetativos de propagación, ya que nunca se producen semillas (Medina, 2010). La partenocarpia facultativa tiene lugar cuando el proceso de polinización y fecundación falla debido a condiciones ambientales como exposición a temperaturas desfavorables (Hazra y Dutta, 2010). La partenocarpia se puede inducir artificialmente mediante la aplicación de extractos de polen, polen muerto o fitohormonas como GAs y Auxinas (Serrani *et al*, 2007b). La partenocarpia también puede lograrse por transgénesis introduciendo transgenes que codifican para enzimas de biosíntesis de GAs como la GA20ox1 (García-Hurtado *et al*, 2012) o transgenes que supriman la expresión de reguladores negativos (gen *SIDELLA*) de la vía de señalización de GAs (Martí *et al*, 2007)

10.3 El cultivar Micro-Tom.

El Micro-Tom es un cultivar de tomate que presenta un fenotipo enano (Figura I.12) y fue desarrollado como planta ornamental a partir de cruce entre los cultivares Florida Basket y Ohio 4013-3 (Scott y Harbaugh, 1989). Este cultivar se caracteriza por tener entrenudos cortos, frutos de pequeño tamaño (3-4g) y una apariencia compacta similar a un arbusto. Inicialmente este cultivar fue desarrollado para fines ornamentales pero ciertas características como su ciclo de vida corto, comparado con cultivares no enanos y que ocupa poco espacio así como su facilidad para la transformación genética lo convirtieron en un cultivar modelo (Carvalho *et al*, 2011). Algunos autores sugieren que el cultivar Micro-Tom constituye un sistema adecuado para investigar la regulación hormonal del cuajado y desarrollo del fruto ya que la fructificación en este cultivar no presenta diferencias significativas en las respuestas a los estímulos hormonales

(Meissner *et al*, 1997; Eyal y Levy, 2002; Serrani *et al*, 2007b). Los ovarios de Micro-Tom se desarrollan normalmente en respuesta a la polinización. Los ovarios no polinizados de este cultivar fructifican partenocárpicamente en respuesta a la aplicación de GAs y auxinas, efecto observado previamente en otros cultivares de tomate (Koshioka *et al*, 1994; Alabadí *et al*, 1996; Alabadí y Carbonell, 1998; Fos *et al*, 2000, 2001).



Figura I.12. Plantas de Micro-Tom.

El fenotipo enano de Micro-Tom es debido a la presencia de varias mutaciones puntuales en los genes: *Dwarf (D)* (que codifica una 6-deoxocatasterona dehidrogenasa, de la ruta de biosíntesis de brasinosteroides, que conduce a un missplicing); *Self-pruning (SP)* (que controla el fenotipo determinado/indeterminado), y del gen *Internode Length Reduction (Ilr)* (probablemente similar a *Miniature*, *Mnt*, aún no caracterizado) (Martí *et al*, 2006). El fenotipo enano de Micro-Tom no es el resultado de deficiencias de GAs. Este cultivar además tiene diversos genes *Cf (Cladosporium fulvum)* de resistencia a hongos (Martí *et al*, 2006).

El cultivar Micro-Tom presenta un hábito de crecimiento determinado a causa de la mutación en el gen *SP* (Figura I.8B). Una planta característica de Micro-Tom se determina después de que aparezcan 6-9 hojas y en la axila de la hoja terminal aparecen dos inflorescencias. Luego en la axila de la hoja anterior a la hoja terminal aparece un brote (brote simpodial) que sigue el siguiente patrón de crecimiento: dos hojas-dos inflorescencias-dos hojas-dos inflorescencias (Figura I.8B) (Carvalho *et al*, 2011). Luego de que la planta se ha determinado y se desarrolla el brote simpodial los meristemas de las axilas inferiores, empezando por las axilas más cercanas al brotes simpodial, comienzan a desarrollar brotes laterales con un patrón similar al brote simpodial. Estos brotes se desarrollan comenzando por las axilas más cercana al brote simpodial. Al cabo de 70-80 días se han desarrollado brotes en casi todas las axilas de la planta confiriéndole un aspecto arbustivo (Figura I.12).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Material biológico

En el presente trabajo se utilizó el cultivar de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Micro-Tom. Este es un cultivar ornamental (Scott y Harbough, 1989) de crecimiento determinado.

Escherichia coli: DH5 α (endA1 hsdR17 (rK -mK+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 Δ (lacIZYAargF) U169 deoR (ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15)

Agrobacterium tumefaciens: LBA4404, derivada de la cepa salvaje Ach5 (Hoekema *et al*, 1983).

2. Secuencias

2.1 Cebadores

Los cebadores empleados en este trabajo fueron suministrados por Invitrogen y Fermentas. Las secuencias de los cebadores de las reacciones de RT-qPCR se tomaron de Serrani *et al*, 2008.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
Clonaje transgén 35S::shRNA2ox		
S1GA2ox4-af	CTCGAGTCTAGAACCTCATCGTTA	51
S1GA2ox4-ar	TCCAAATCCAATTTCTTATTGCCA	45
S1GA2ox1-bf	TGGCAATAAGAAATTGGATTTGGA	45
S1GA2ox1-br	CCACTCTATGTCTCACACTCTTAA	49
S1GA2ox3-cf	TTAAGAGTGTGAGACATAGAGTGG	49
S1GA2ox3-cr	ATCGATGGTACCTATAAATATTAG	44
attB1shRNA2ox	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATCTCGAGTCTAGAACCTCATCG	80,4
attB2shRNA2ox	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCGATGGTACCTATAAATAT	76,8
Clonaje transgén 35S::amiRNA2ox1		
A	CTCGAGTCTAGAACCTCATCGTTA	57,6
B	TCCAAATCCAATTTCTTATTGCCA	57,8
I	TGGCAATAAGAAATTGGATTTGGA	45
II	CCACTCTATGTCTCACACTCTTAA	49
III	TTAAGAGTGTGAGACATAGAGTGG	49
IV	ATCGATGGTACCTATAAATATTAG	44
attB1amiRNA2ox1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAAACACACGCTCGGACGCAT	85,7
attB2amiRNA2ox1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCGATGGCGATGCCTTAAATAAA	82,4

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
RT-qPCR		
S1GA2ox1-qF1	GGCATGTAAGATATTAGAATTGA	51,75
S1GA2ox1-qR1	TTAATCCGTAGTAGAGAATCAGA	51,48
S1GA2ox2-qF1	TCCCACCATGTTAGGAATTAT	54,51
S1GA2ox2-qR1	TGTAAGCCCACAATGAGCATC	59,54
S1GA2ox3-qF1	GACCCTTCTACTTTTCAGCTC	51,74
S1GA2ox3-qR1	AAATTGAATTGTCTTCTATCCA	51,83
S1GA2ox4-qF1	ATGGAAGGAAAAGACAGTTTA	51,82
S1GA2ox4-qR1	CTTTTCTCAAATAGGACCAAC	51,82
S1GA2ox5-qF1	GATCACTTACCAATAATCAACAG	51,82
S1GA2ox5-qR1	CGTCATGGTTTACGACTTTA	52,38
S1GA20ox1-qF1	CTCATTTCTAATGCTCATCGT	53,17
S1GA20ox1-qR1	TGCAGATGATTCTTTCTTAGCG	58,21
S1GA20ox2-qF1	TTTCCATATCTACCCTACAAG	51,60
S1GA20ox2-qR1	TCATCGCATTACAATACTCTT	51,18
S1GA20ox3-qF1	AGCCAAATTATGCTAGTGTTAC	51,85
S1GA20ox3-qR1	TTTTATGAGATTTGTGTCAACC	52,97
S1GA3ox1-qF1	GGCATTAGTAGTTAATATAGGTGA	50,55
S1GA3ox1-qR1	AAATAAGCTACAGAAAAGTCGATA	51,05
S1GA3ox2-qF1	GATCATAAATTTGTCATGGATAC	51,54
S1GA3ox2-qR1	TGTTTCCATATGGTTAAGTAATC	51,53
S1Act-Fq2	GAAACCTTCAACACCCCTGC	60,31
S1Act-Rq2	TGGGAAGTGTGGCTGACA	62,18

2.2 Secuencias empleadas en el fragmento shRNA2ox

S1GA2ox1 (188bp)

5'-AATTGGATTTGGAGAGCATAACAGACCCTCAGATCTTGACCATCTTAAGATCAAACGATGCTC
CTGGCCTACAAATATCAACTCAACAAGGATTGTGGGTCCCCGTATCACCTCACCCGAATACTGC
TTTTTCCATCTTCGTTGGAGACACTTTACAGGCTCTGACAAATGGAAGTTTAAGAGTGTGA-3'

S1GA2ox3 (123bp)

5'-GACATAGAGTGGTGTCAATAAATTCATGGAAAAGTAGAATGTCCATGATGTACTTTGCAGC
TCCTGCTCTTGGCGCTTGATAAGTGCTCCTCCTCAAATCAACAATATTACTAATATTTATA-3'

SIGA2ox4 (163bp)

5'-ACCTCATCGTTAATGCCTGCGAAGAATTCGGATTCTTCAAAGTCATAAACCATGATGTTCCCT
ATGGAATTCATAAGTAAACTCGAATCCGAAGCCGTTAAATTCTTCTCCTCTCCCCTCTCTGAGA
AACTAAAGGCAGGGCCTGCTGATCCTTTTGGTTATGG-3'

3. Vectores

- pGEM-T Easy (Amp^r, *lacZ*, promotores T7 y SP6) suministrado por Promega.
- pDNOR221 (Kan^r, sitios de recombinación *attP1* y *attP2*, gen *ccdB*) suministrado por Invitrogen.
- pRS300 (Amp^r, promotores T7 y SP6, precursor miR319a de *Arabidopsis thaliana*) (Schwab *et al*, 2006).
- pK7GWIWG2 (II) (Kan^r (*nptII*), Sp^r, sitios de recombinación *attR1* y *attR2*, gen *ccdB*, promotor CaMV35S, intrón (Nº referencia: ac007123.empl) de *Arabidopsis thaliana* (Karimi *et al*, 2002).
- pK2GW7 (Kan^r (*nptII*), Sp^r, sitios de recombinación *attR1* y *attR2*, *ccdB*, promotor CaMV35S) ((Karimi *et al*, 2002).

4. Kits y Enzimas

4.1 Kits

- pGEM-T Easy kit suministrado por Promega.
- Expand High Fidelity PCR System suministrado por Roche.
- High Pure Plasmid Isolation kit suministrado por Roche.
- PureLink™ Gel Extraction Kit suministrado por Invitrogen.
- RNasy Plant Mini Kit suministrado por Qiagen.
- DNasy Plant Mini Kit suministrado por Qiagen.
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit suministrado por Applied Biosystems.
- Power SYBR Green PCR Master Mix suministrado por Applied Biosystems.

4.2 Enzimas

- GoTaq Flexi DNA Polymerase suministrada por Promega.
- KpnI suministrada por Promega.
- BP Clonase Enzyme Mix II suministrada por Invitrogen.
- LR Clonase Enzyme Mix II suministrada por Invitrogen.
- Turbo DNase suministrada por Ambion.

5. Columnas empleadas en la purificación de GAs.

- **SAX** (BondElut SS-SAX; 500mg, 3mL; Varian Scharlau, Ref 01212-4041): Intercambiador aniónico fuerte (ideal para purificación de ácidos carboxílicos).
- **C₁₈** (BondElut C₁₈; 500mg, 3mL; Varian Scharlau, Ref 01210-2028): Sílica No polar, Fase Reversa.
- **OASIS HLB** (Waters, 30mg, 1mL, 30µm de tamaño particular, Ref 186003908): Absorbente polimérico de fase reversa para la extracción de amplio rango de compuestos ácidos, básicos y neutros.
- **OASIS MCX** (Waters, 30mg, 1mL, 30µm de tamaño particular, Ref 186000252): Absorbente polimérico para extraer compuestos básicos con grupos catiónicos.
- **OASIS WAX** (Waters, 30mg, 1mL, 60µm de tamaño particular, Ref 186002491): Absorbente polimérico de fase reversa y de intercambio aniónico para extraer compuestos ácidos fuertes.

6. Soluciones y medios de cultivo.

6.1 Soluciones y medios de cultivo usadas en cultivo *in vitro* de plantas

En la preparación de los medios de cultivos de plantas se emplearon la solución mineral de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), suministrada por la firma Comercial Duchefa Biochimie B.V (Haarlem, Holanda) y la solución vitamínica SH.

-Solución vitamínica SH: riboflavina (0,25 mg/L), ácido nicotínico (2,5 mg/L), tiamina-HCl (10 mg/L), piridoxina-HCl (1 mg/L), ácido fólico (0,5 mg/L), biotina (0,05 mg/L), D-pantotenato cálcico (0,5 mg/L), colina-HCl (0,1 mg/L), glicina (0,5 mg/L), L-cisteína (1 mg/L), ácido málico (10 mg/L); ácido ascórbico (0,5 mg/L).

-Medio de germinación (MG): MS (4,3 g/L), sacarosa (10 g/L), agar (8 g/L).

-Medio de precultivo (IK 4,0/4,0): MS (4,3 g/L), sacarosa (30 g/L), myo-inositol (0,1 g/L), solución vitamínica SH 100X (10 mL/L), IAA (0,004 g/L), kinetina (0,004 g/L), agar (8 g/L).

-Medio de cocultivo (IK 4,0/4,0): MS (4,3 g/L), sacarosa (30 g/L), myo-inositol (0,1 g/L), solución vitamínica SH 100X (10 mL/L), IAA (0,004 g/L), kinetina (0,004 g/L), acetosiringona (200 µM), agar (8g/L).

-Medio de lavado (ML): MS (4,3 g/L), sacarosa (30 g/L), myo-inositol (0,1 g/L).

-Medio de inducción de organogénesis IKZ 4,0/4,0/1,0: MS (4,3 g/L), sacarosa (30 g/L), myo-inositol (0,1 g/L), vitaminas SH 100X (10 mL/L), IAA (0,004 g/L), kinetina (0,004 g/L), zeatina (0,001 g/L), cefotaxima (300 mg/L), kanamicina (100 mg/L), agar (8 g/L).

-Medio de enraizamiento (ME): MS (4,3 g/L), sacarosa (20 g/L), myo-inositol (0,1 g/L), IAA (0,0001 g/L), kanamicina (100 mg/L), agar (8 g/L)

Notas.

1. El pH del medio se ajustó a 5,7 con NaOH antes de añadir el agar.
2. Los medios de cultivo se esterilizaron por calor húmedo en autoclave, a 121°C durante 20 minutos.
3. Las vitaminas se disolvieron en agua; se prepararon soluciones stock concentradas 100x, se almacenaron a -20°C y se añadieron al medio antes de ajustar el pH.
4. La zeatina (1 mg/L) y los antibióticos se esterilizaron por microfiltración usando filtros de 0,2 µm de la casa comercial Corning y se añadieron posteriormente en cabina de flujo laminar tras la esterilización del medio de cultivo.

6.1.1 Uso de los medios de cultivo en la transformación de tomate.

ETAPA DE TRANSFORMACIÓN	MEDIO DE CULTIVO	ANTIBIÓTICO (mg/L)	
		kanamicina	cefotaxima
Germinación y cultivo de plántulas	MG	-	-
Precultivo de explantos	IK 4,0/4,0	-	-
Infección	IK 4,0/4,0+Acetosiringona 200 µM	-	-
Lavado	ML	-	500
Cultivo sin presión selectiva	IK 4,0/4,0	-	400
Inducción de organogénesis	IK 4,0/4,0/1,0	100	300
Enraizamiento	ME	100	-

6.2 Medios de cultivo específicos de bacterias

Medio LB (Luria-Bertani): Triptona 10 g/L; Extracto de levadura 5 g/L; NaCl 5g/L.

Para la selección de transformantes bacterianos el medio de cultivo se suplementó con el antibiótico al cual confería resistencia el plásmido en estudio usando las siguientes concentraciones:

ANTIBIÓTICO	Concentración (µg/µL)	
	<i>E.coli</i>	<i>A.tumefaciens</i>
ampicilina	100	-
kanamicina	50	-
espectinomicina	50	50
rifampicina	-	100

MÉTODOS

1. Condiciones de cultivo y tratamientos hormonales en plantas

1.1 Cultivo *in vitro*

Para el cultivo *in vitro*, el primer paso fue esterilizar las semillas. Primero se pusieron las semillas en bolsitas de malla y se sumergieron en agua destilada durante 30 min, para hidratarlas. Después, en cabina de flujo laminar, se esterilizaron por inmersión durante 30 min, en una solución diluida al 30% (v/v) de lejía comercial (5% de hipoclorito de sodio). A continuación se eliminó la solución desinfectante mediante 3 lavados sucesivos con agua destilada estéril (5, 10 y 15 min, respectivamente). Tras la desinfección de las semillas, se abrieron las bolsitas que las contenían con ayuda de pinzas y un escalpelo estériles. Según el experimento realizado, se depositaron sobre la superficie del medio de germinación (MG), contenido en botes de cristal (9 cm de diámetro y 10 cm de altura) o sobre papel de filtro de filtro Whatman No. 1 (Fisher) en placas Petri. La incubación tuvo lugar en cámara de cultivo en condiciones de día largo (16 h de luz y 8h de oscuridad), con una intensidad luminosa de 2.000 luxes suministrada por una fuente de luz fría. La temperatura fue de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa (HR) fue del 70% (durante el período oscuro) y 40% (durante el período luminoso).

1.2 Cultivo en condiciones de invernadero

Para la siembra en condiciones de invernadero se usaron macetas de 12cm de diámetro y una mezcla 2:1:1 de turba negra:perlita:vermiculita. El riego se realizó por goteo 2 veces al día usando solución nutritiva cuya composición se detalla en la tabla M.1.

Tabla M.1. Composición de la solución nutritiva suministrada en el riego por goteo a las plantas

Producto	Composición
H ₃ PO ₄	0,15 (g/L)
Ca(NO ₃) ₂	0,82 (g/L)
KNO ₃	0,2 (g/L)
K ₂ SO ₄	0,35 (g/L)
MgSO ₄	0,24 (g/L)
BMX (Micronutrientes)	0,1 (g/L)

El cultivo se realizó en condiciones de día largo (16 h de luz y 8h de oscuridad). La luz se suplementó mediante lámparas de vapor de mercurio de 400 w. La temperatura se mantuvo dentro de un rango de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante el día y de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante la noche. La humedad relativa osciló entre 45-65% (diurna) y 75-90% (nocturna).

1.3 Tratamientos hormonales.

1.3. 1 Plántulas

Para los tratamientos de plántulas empleamos ácido giberélico (GA₃) y el inhibidor de biosíntesis de GAs, paclobutrazol (PCB), ambos suministrados por la firma comercial Duchefa Biochimie B.V (Haarlem, Holanda). Para el PCB usamos una concentración final de 10⁻⁷M y para el GA₃ usamos 10⁻⁵M. En ambos casos se adicionaron 25 µL de la concentración seleccionada, disuelta en etanol absoluto, a un volumen final de 50 mL de MG. Debido al efecto inhibitorio del PCB sobre la germinación, las semillas se colocaron primero sobre papel de filtro Whatman No. 1 (Fisher) en placas Petri en condiciones estériles tal como se describe en el apartado 1.1. Una vez germinadas las semillas se pasaron al MG suplementado con PCB o GA₃. Como control se empleó MG suplementado con 25 µL de etanol absoluto. Para cada dosis se usaron 3 botes de medio de cultivo, cada uno con 20 semillas.

1.3. 2 Plantas adultas

En plantas adultas empleamos el inhibidor de biosíntesis de GAs, paclobutrazol (PCB). En este caso usamos dos dosis diferentes: 10⁻⁶M y 10⁻⁵M, disueltas en la solución de riego. La aplicación del PCB se hizo por riego en días alternos durante 15 días para un total de 6 aplicaciones. Las plantas seleccionadas fueron plantas jóvenes de 27 días de edad, en floración pero antes de la anthesis. Como control empleamos plantas regadas solamente con solución nutritiva. En cada grupo de dosis se emplearon 10 plantas de la línea transgénica L1 y el silvestre.

2. Métodos de biología molecular

2.1 Transformación de cepas bacterianas

La preparación de células competentes de *E.coli* y *A.tumefaciens* para su transformación mediante electroporación se llevó a cabo según el protocolo recomendado por el fabricante del electroporador Gene Pulser System®, BioRad. Para la electroporación se descongeló en hielo una alícuota de 40 µL de células competentes a las que se añadió 1 µL de vector transformante. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación estéril de 0,1 cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo, y se sometió a un pulso eléctrico con un aparato Gene Pulser® (BioRad). Las condiciones de electroporación fueron 200 Ω, 25µF y 1,8 kV para *E. coli*, y 400 Ω, 25 µF y 1,8kV para *A. tumefaciens*. Después del pulso eléctrico las células se resuspendieron en 1 mL de medio LB en condiciones estériles y se incubaron 1h a 37°C y 200 r.p.m. para *E. coli* y 3 h a 28 °C y 200 r.p.m. para *A. tumefaciens*. Finalmente se sembraron en placas Petri con medio LB sólido, suplementado con el antibiótico al cual confería resistencia el plásmido en estudio. Los antibióticos empleados así como la concentración a la

que fueron usados, aparecen en el apartado 6.2 de Materiales. Los cultivos se incubaron toda la noche en estufa a 37°C en el caso de *E. coli* y tres días a 28°C en caso de *A. tumefaciens*.

2.2 Verificación de transformantes bacterianos mediante PCR

Para la confirmación de clones positivos en cada paso de clonaje empleamos la técnica de PCR tomando directamente una alícuota del cultivo de bacterias (*E.coli* y *A. tumefaciens*) sin pasos previos de purificación de DNA plasmídico. Para ello, previamente inoculamos una colonia aislada en 4mL de medio de cultivo LB e incubamos durante 16-18h a 37°C, 200 r.p.m. Del cultivo crecido tomamos 2µL y lo añadimos directamente en la siguiente mezcla de PCR: Buffer Green GoTaq Flexi DNA Polymerase 1X, MgCl₂ 1,0mM, mezcla de dNTPs 0,2mM (de cada dNTP), cebadores (0,5µM cada uno), GoTaq Flexi DNA Polymerase 1,25U. El volumen final de reacción fue 25µL. Las parejas de cebadores usados son las que se muestran en la Tabla M.2 y los programas de amplificación usados para cada pareja se detallan en la Tabla M.3.

Tabla M.2. Parejas de cebadores usados en la verificación de transformantes bacterianos durante los clonajes realizados para generar las construcciones 35S::shRNA2ox y 35S::amiRNA2ox1

Pareja cebadores	Uso
SIGA2ox4-af SIGA2ox3-cr	Verificación de la inserción del fragmento shRNA2ox en vectores pGEM-T Easy y pDNOR221
A / B	Verificación de la inserción del fragmento amiRNA2ox1 en vector pGEM-T Easy
attB1amiRNA2ox1 attB2amiRNA2ox1	Verificación de la inserción fragmento amiRNA2ox1 en vectores pDNOR221 y pK2GW7.

Tabla M.3. Programas de PCR empleados para la verificación de transformantes bacterianos en los distintos clonajes realizados. En todas las reacciones se empleó un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a 95°C y para la extensión final una temperatura de 72°C durante 5 minutos.

CEBADORES	DESNATURALIZACIÓN		HIBRIDACIÓN		EXTENSIÓN		
	TEMP (°C)	t	TEMP (°C)	t	TEMP (°C)	t	CICLOS
SIGA2ox4-af SIGA2ox3-cr	95	30s	40	30s	72	30s	5
	95	30s	47	30s	72	30s	25
A / B	95	1 min	55	1 min	72	1 min	30
attB1amiRNA1 attB2amiRNA1	95	45s	60	45s	72	1 min	25

2.3 Purificación de ácidos nucleicos

2.3.1 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* y *A. tumefaciens*

E. coli

Para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el kit comercial High Pure Plasmid Isolation kit de Roche de acuerdo a las instrucciones del fabricante, partiendo de un cultivo de 4 mL cultivado durante 16-18h en medio líquido LB suplementado con el antibiótico correspondiente, a 37°C y 200 r.p.m.

A. tumefaciens

Para las preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico de *Agrobacterium tumefaciens* también se utilizó el kit comercial High Pure Plasmid Isolation kit de Roche partiendo de un cultivo de 15 mL, cultivado durante una noche en medio líquido LB suplementado con el antibiótico correspondiente. El protocolo a seguir es el mismo que para *E. coli* pero, como la pureza de la preparación de DNA obtenida por este procedimiento no es suficientemente alta para realizar análisis de restricción del plásmido se utilizó una alícuota de 1 µL de esta preparación de DNA para retransformar *E. coli*. De los clones transformantes de *E. coli* obtenidos de ese modo, se realizó una nueva preparación de DNA plasmídico que se utilizó para el análisis de restricción.

2.3.2 Extracción de DNA genómico de tejidos vegetales

Para determinar la presencia del transgén *35S::amiRNA2ox1* en las plantas transformadas se extrajo el DNA genómico a partir de 100 mg de tejido de hoja usando el kit comercial DNeasy Plant Mini kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración del DNA extraído se determinó a partir de la absorbancia a 260nm usando un espectrómetro Nanodrop ND-1000 (Wilmington, Delaware USA) y se determinó la integridad por análisis en gel de agarosa.

2.3.3 Extracción de RNA de tejidos vegetales

Para el análisis de la expresión de los genes *SIGA2ox* por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) se extrajo el RNA total a partir de diferentes tejidos de la planta. Al momento de su recolección el tejido se congeló en nitrógeno líquido y posteriormente se trituró empleando un mortero. Para extraer el RNA se empleó el kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, partiendo de 100mg del tejido previamente triturado. Para eliminar restos de DNA genómico, luego de extraído el RNA se trató con la DNAasa libre de RNAasa de Ambion, Turbo DNase de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. La concentración de RNA total se midió usando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Wilmington, Delaware USA) y se determinó la integridad por análisis en gel de agarosa en

condiciones no desnaturalizantes. Los tejidos empleados para la extracción de RNA total fueron:

- **Raíz:** Raíces totales de plantas de 90 días de edad (3 plantas por réplica biológica).
- **Tallo:** Porciones de tallo que comprenden desde el primer hasta el quinto entrenudo. Se eliminaron las hojas y la porción apical, dejando solamente el tallo y las yemas axilares. Las plantas empleadas tenían 27 días de edad y en ellas ya habían aparecido las primeras inflorescencias pero aún no habían llegado a la antesis (3 plantas por réplica biológica).
- **Porción apical:** Porción apical formada por el ápice del tallo y las 3 hojas más jóvenes de la planta. Estas muestras se recogieron luego de que hubieran aparecido las primeras inflorescencias pero antes que la mayor de las flores de la inflorescencia fuera mayor de 4mm. Para este análisis se eliminaron las inflorescencias (5 plantas por réplica biológica).
- **Hipocotilos:** Hipocotilos de plántulas de 7 y 13 días de edad. En la muestra de hipocotilos de 7 días (silenciamiento genes *SIGA2ox* de las líneas transgénicas *35S::shRNA2ox*) se emplearon al menos 5 hipocotilos por réplica biológica y en los hipocotilos de 13 días (medición expresión genes *SIGA2ox* en plántulas tratadas con GA_3 y PCB) se usaron al menos 15 hipocotilos por réplica.
- **Porción apical plántulas:** Porción apical de plántulas de 13 días de edad, conteniendo el meristemo apical y los dos cotiledones (al menos 15 plántulas por réplica biológica).
- **Plántulas:** Plántulas enteras de 11 días (11 plántulas por réplica biológica)
- **Hojas:**
 - Hojas jóvenes de la porción apical de plantas adultas de 90 días de edad (3 plantas por réplica biológica).
 - Foliolo terminal de la hoja terminal de plantas de 35 días de edad en las cuales ya las primeras flores hubieran llegado a la antesis (3 plantas por réplica biológica en líneas transgénicas y 7 plantas por réplica biológica en plantas silvestres).
 - Quinta hoja de plantas de 45 días de edad (4 plantas por réplica biológica en líneas transgénicas y 5 plantas por réplica biológica en plantas silvestres).
- **Ovarios 2DAA:** Ovarios 2 días antes de la antesis (13 ovarios por réplica biológica).
- **Ovarios d0:** Ovarios de flores al día de la antesis (12 ovarios por réplica biológica).
- **Flores en antesis:** Flores enteras en antesis (6 flores por réplica biológica).

- **Ovarios 5DPA-P:** Ovarios polinizados 5 días post-antesis (10 ovarios por réplica biológica).
- **Ovarios 10DPA-P:** Ovarios polinizados 10 días post-antesis (5 ovarios por réplica biológica en las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* y 10 ovarios por réplica biológica en las plantas transgénicas *35S::amiRNA2ox1*).
- **Ovarios 20DPA-P:** Ovarios polinizados 20 días post-antesis (8 ovarios por réplica biológica).
- **Ovarios 5DPA-E:** Ovarios emasculados 5 días post-antesis (10 ovarios por réplica biológica).

2.4 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa se empleó para determinar la integridad de los ácidos nucleicos purificados, separar fragmentos de DNA para su purificación y para comprobar resultados de reacciones de PCR. Se emplearon geles de agarosa de entre 0,5-1,5% (m/v), disueltos en tampón TAE (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) y a los cuales se les añadió el agente intercalante bromuro de etidio a una concentración final de 0,5µg/mL. Las muestras se cargaron en el gel disueltas en tampón de carga (glicerol 30% (v/v); bromofenol azul 0,25% (m/v)). La electroforesis se hizo a un voltaje constante de 120V. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Macrovue transilluminator modelo 2011, LKB Produkter; Bromma Suecia).

2.5 RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Para el estudio de la expresión por RT-qPCR de los genes *SIGA2ox* se emplearon los cebadores descritos en Serrani *et al*, 2008, excepto la pareja de cebadores del gen *SIActina* que fue diseñada usando el programa Primer Express v2.0 (Applied Biosystems). Las secuencias detalladas aparecen en el capítulo de Materiales, apartado 2.1. Luego de extraído y cuantificado el RNA total, tal como se explica en el apartado 2.3.3, se usó un 1µg para la síntesis del DNA complementario (cDNA) usando el kit de Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las mezclas de reacción se realizaron en las placas “MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate with Barcode” de Applied Biosystems a un volumen final de 25µL usando el kit Power SYBR Green PCR Master Mix también de Applied Biosystems.

Para cada gen y tejido analizado se usaron tres réplicas biológicas y al menos dos réplicas técnicas. Para cada pareja de cebadores se determinó la combinación de concentraciones óptima siguiendo las recomendaciones de Applied Biosystems (SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit

User Guide) y se calculó la eficiencia a partir una curva patrón hecha tomando como molde diluciones seriadas de una mezcla de cDNAs de diferentes tejidos de tomate.

El valor de expresión de cada gen se determinó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) como sigue:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{(\Delta Ct \text{ (muestra)} - \Delta Ct \text{ (control)})}$$

Donde:

$$\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct \text{ (gen de interés)} - Ct \text{ (gen endógeno)}.$$

$$\Delta Ct_{\text{control}} = Ct \text{ (gen de interés)} - Ct \text{ (gen endógeno)}.$$

-Ct (Ciclo umbral. Es calculado por el software del equipo 7500 Fast Real-Time PCR System y es el ciclo donde comienza a detectarse el amplicón).

Para el análisis de expresión de los genes *SIGA2ox* en las líneas transgénicas el $\Delta Ct_{\text{muestra}}$ corresponde al valor calculado en las plantas transgénicas y el $\Delta Ct_{\text{control}}$ corresponde al valor calculado en las plantas silvestres. En el análisis de la expresión relativa de los genes *SIGA2ox* en diferentes tejidos se usó como $\Delta Ct_{\text{control}}$ el valor de cada gen calculado en raíces y en el análisis de expresión en ovarios se usó como referencia en cada gen el estadio de 2 días antes de la antesis (d-2). Como gen endógeno se empleó el gen *SIActina*. Para poder comparar datos de diferentes experimentos en cada placa se analizó el gen de interés y el gen endógeno.

3. Obtención plantas transgénicas de tomate

3.1. Silenciamiento múltiple genes *SIGA2ox*: Diseño de fragmento *shRNA2ox*

Para realizar silenciamiento génico post-transcripcional de todos los genes *SIGA2ox* escogimos una construcción tipo horquilla (shRNA) conteniendo un fragmento híbrido que contenía secuencias de los genes *SIGA2ox1*, *SIGA2ox3* y *SIGA2ox4*. Los fragmentos seleccionados se amplificaron por PCR a partir de los clones de cDNA previamente obtenidos por Serrani *et al*, 2007a, empleando los cebadores descritos en el apartado 2.1 del capítulo de Materiales y siguiendo los programas que se muestran en la tabla M.4. A este fragmento además se le añadieron en el extremo 5' los sitios de restricción XhoI y XbaI y en el extremo 3' los sitios ClaI y KpnI para facilitar análisis posteriores de restricción. Los fragmentos obtenidos se purificaron a partir de gel de agarosa usando el kit de Invitrogen PureLink™ Quick Gel Extraction Kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante y posteriormente se unieron por PCR solapante tal como se muestra en la Figura M.1, dando como resultado un fragmento de 506pb.

Tabla M.4. Programas de PCR empleados en el proceso de clonaje del fragmento shRNA2ox. En todas las reacciones se empleó un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a 95°C y para la extensión final una temperatura de 72°C durante 5 minutos

CEBADORES	DESNATURALIZACIÓN		HIBRIDACIÓN		EXTENSIÓN		
	TEMP (°C)	t	TEMP (°C)	t	TEMP (°C)	t	CICLOS
SIGA2ox4-af SIGA2ox4-ar	95	30s	50	30s	72	30s	25
SIGA2ox1-bf SIGA2ox1-br	95	30s	50	30s	72	30s	25
SIGA2ox3-cf SIGA2ox3-cr	95	30s	50	30s	72	30s	25
SIGA2ox4-af SIGA2ox3-cr	95	30s	40	30s	72	30s	5
	95	30s	47	30s	72	30s	25

El fragmento resultante de 506pb se clonó en el vector pGEM-T Easy y los transformantes seleccionados se verificaron mediante PCR de colonias usando los cebadores SIGA2ox4-af y SIGA2ox3-cr de acuerdo a las condiciones descritas en el apartado 2.2. A partir de los clones positivos se purificó el DNA plasmídico usando el kit comercial High Pure Plasmid Isolation kit y se envió a secuenciar en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de Valencia (IBMCP) para comprobar que los fragmentos habían quedado unidos correctamente y no existían errores en las secuencias.

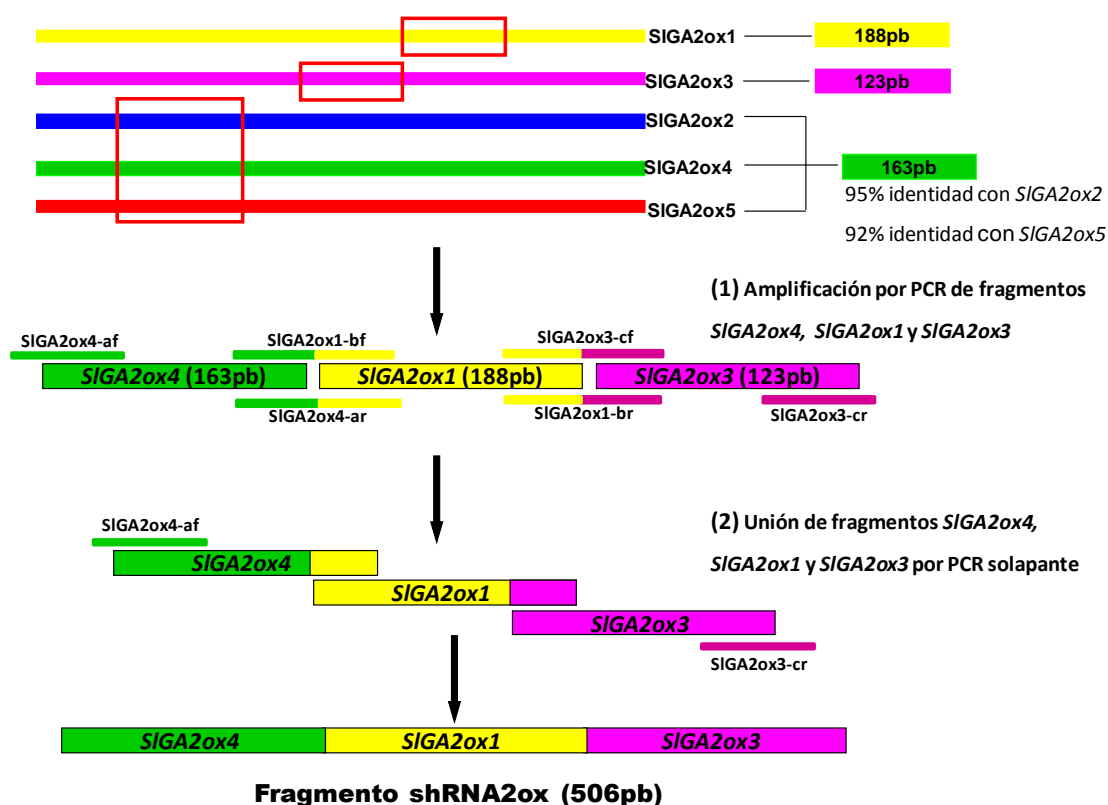


Figura M.1. Esquema de construcción de fragmento quimérico shRNA2ox para silenciar expresión de genes SIGA2ox.

3.2. Silenciamiento gen *SIGA2ox1*: Diseño de fragmento *amiRNA2ox1*

Para silenciar el gen *SIGA2ox1* se escogió el sistema de amiRNAs desarrollado por Schwab *et al*, 2006, basado en el pre-miR319a de *Arabidopsis thaliana*. En este sistema el pre-miRNA miR319a, de 400pb aproximadamente, se encuentra clonado en el vector pRS300 y dentro de su secuencia está contenida la secuencia de 21nt correspondiente al miRNA319a. La estrategia de clonaje consiste en sustituir mediante PCR solapante la secuencia correspondiente al miRNA319a por el amiRNA específico para el gen que se desea silenciar. Cuando esta estructura se introduce en la planta y se transcribe se generarán los miRNAs que serán reconocidos por la maquinaria de silenciamiento y de esta forma conducirán a la degradación del RNA mensajero de interés. Para el diseño y clonaje del fragmento amiRNA2ox1, específico para silenciar el gen *SIGA2ox1* se siguieron las indicaciones de Ossowski *et al*, 2008 y Schwab *et al*, 2006. Se empleó la plataforma informática gratuita WMD (Web Micro-RNA Designer) (<http://wmd3.weigelworld.org>). En esta página web se introduce en formato FASTA la secuencia del gen *SIGA2ox1* y como resultado se obtiene una lista de secuencias de posibles amiRNAs específicos para el gen de interés y los 4 cebadores necesarios para sustituir las secuencias en el cassette del pre-miRNA319a. Para la sustitución del fragmento amiRNA2ox1 en el cassette se realizaron 4 reacciones de PCR (a, b, c y d) esquematizadas en la Figura M.2 de forma consecutiva.

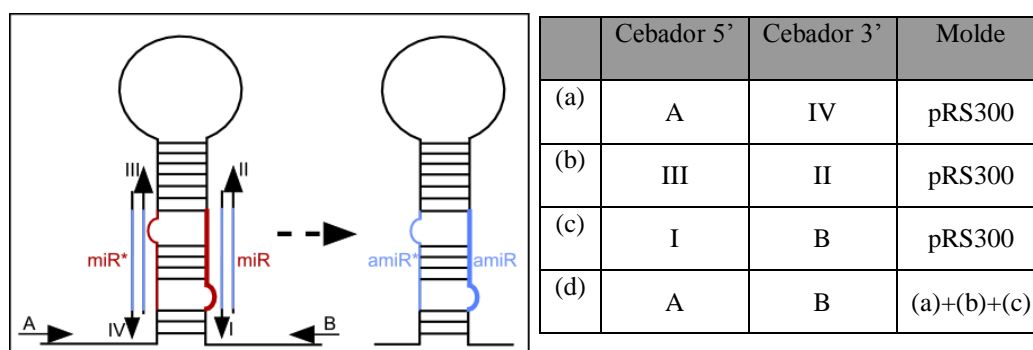


Figura M.2. Esquema de sustitución de fragmento amiRNA1 en cassette pre-miRNA139a para silenciar expresión de gen *SIGA2ox1*. I (microRNA2ox1 5'); II (microRNA2ox1 3'); III (microRNA2ox1* 5') y IV (microRNA2ox1* 3')

Las secuencias de los cebadores empleados aparecen en Materiales, apartado 2.1.

3.3 Clonaje de fragmentos shRNA2ox y amiRNA2ox1 usando tecnología Gateway.

La tecnología Gateway o tecnología de clonación por recombinación *in vitro* fue desarrollada, patentada y comercializada por la firma comercial Invitrogen Life technologies (Hartley *et al*, 2000). Es un sistema de clonación alternativo a los sistemas tradicionales que se basa en las recombinasas de sitio específico que producen la integración y escisión del fago lambda en el cromosoma de la bacteria *E. coli*. No necesita el uso de enzimas de restricción ni de ligación, por lo

que permite completar pasos de clonaje en menor tiempo que las técnicas tradicionales. Además posee un sistema de selección doble: resistencia a antibióticos como kanamicina y espectinomycin y el gen letal *ccdB*. Hasta la fecha se han desarrollado varios vectores binarios para la introducción de transgenes en plantas basados en esta tecnología (Karimi *et al*, 2002; Mann *et al*, 2012). Los sitios de recombinación se denominan att (siguiendo la nomenclatura del fago lambda) y hay cuatro tipos de sitios: attB, attL, attP y attR. Estos sitios deben estar flanqueando el fragmento que se desea clonar y el sitio del vector donde se desea insertar. Las reacciones de recombinación compatibles son: attBxattP (reacción BP) y attLxattR (reacción LR). En este trabajo se añadieron los sitios attB a los fragmentos shRNA2ox y amiRNA2ox1, previamente clonados en el vector pGEM-T Easy, mediante PCR usando los oligos descritos en el apartado 2.1 de Materiales y luego se clonaron en el vector pDNOR221, haciendo una reacción de recombinación BP (tal como se muestra en la Figura M.3) usando la BP Clonase Enzyme Mix II de Invitrogen de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

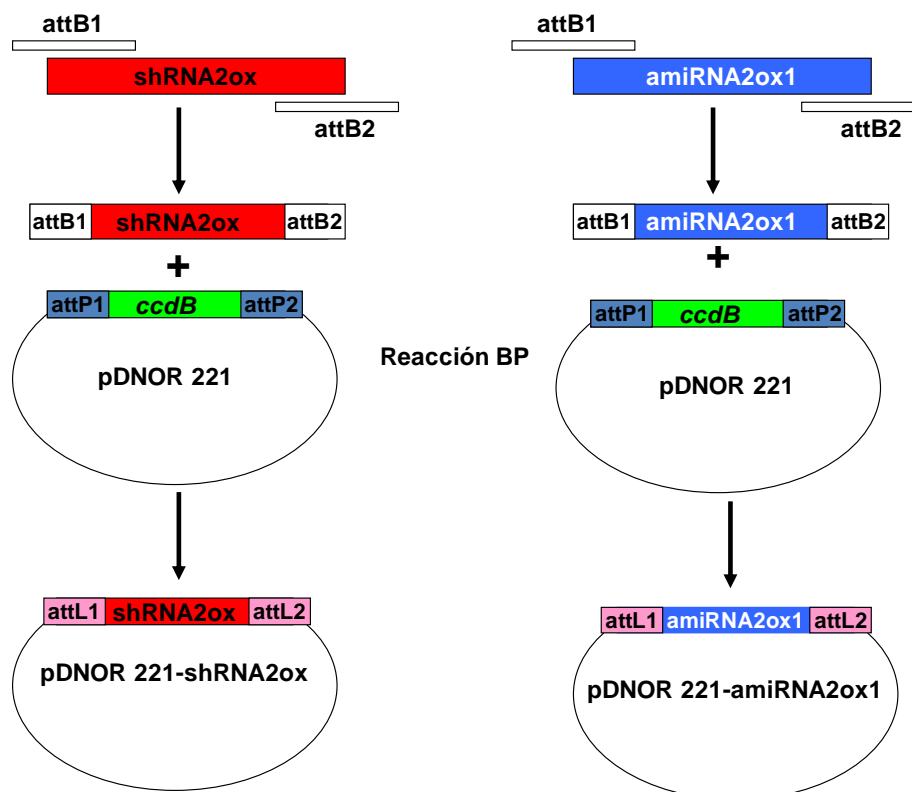


Figura M.3. Representación esquemática del clonaje de los fragmentos shRNA2ox y amiRNA2ox1 en el vector pDNOR221 usando la tecnología Gateway.

El paso final de clonaje, en el cual quedaron clonados los fragmentos shRNA2ox y amiRNA1 en los vectores de expresión, se realizó por una reacción LR (Figura M.4) empleando la LR Clonase Enzyme Mix II también suministrada por Invitrogen.

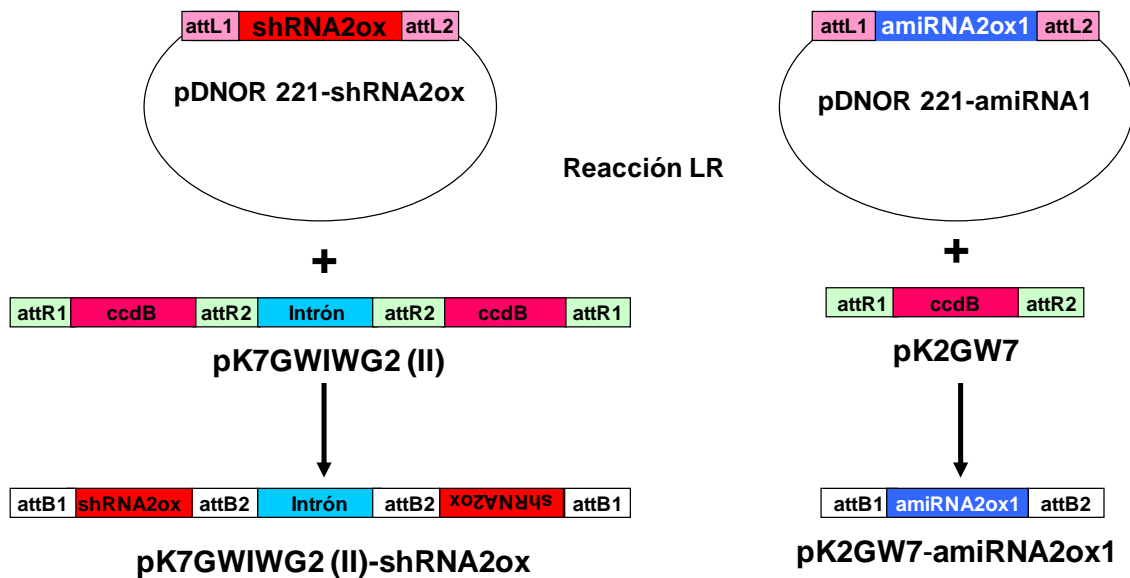


Figura M.4. Representación esquemática del clonaje de los fragmentos shRNA2ox y amiRNA2ox1 en los vectores binarios pK7GWIWG2 (II) y pK2GW7 usando la tecnología Gateway.

En cada paso de clonaje los clones positivos se verificaron por PCR tal y como se describe en el apartado 2.2. Los vectores binarios usados fueron pK7GWIWG2 (II) y pK2GW7 respectivamente. Los cassetes de expresión quedaron conformados tal como se muestra en la figura M.5.

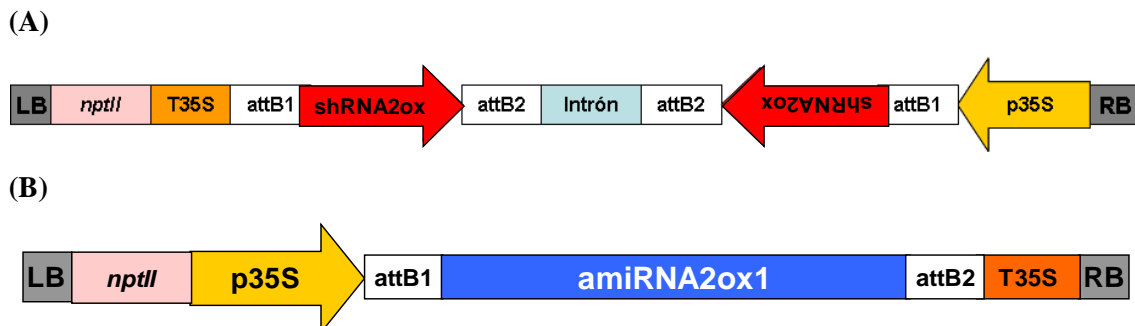


Figura M.5. Representación esquemática de las construcciones 35S::shRNA2ox (A) y 35S::amiRNA2ox1 (B). En ambos casos se empleó el promotor constitutivo 35S y el gen *nptII* (que confiere resistencia a kanamicina).

El último paso de clonaje se verificó por PCR en el caso del fragmento amiRNA2ox1. En el caso de la construcción shRNA2ox el último paso de clonaje se verificó por digestión enzimática con el enzima KpnI, puesto que la construcción genera una estructura en forma de horquilla difícil de amplificar por PCR. A partir de las colonias positivas se purificó el DNA plasmídico usando el kit comercial High Pure Plasmid Isolation kit y se envió a secuenciar en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de Valencia (IBMCP) para comprobar que los fragmentos habían quedado en la orientación adecuada y las secuencias no tenían errores. Una vez que se tuvieron los fragmentos clonados en los vectores

de expresión se transformó *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA 4404 y posteriormente se procedió a transformar tomate (cv Micro-Tom).

3.4. Transformación genética de tomate

Las plantas transgénicas se obtuvieron aplicando el método de transformación genética estable descrito por Ellul *et al*, 2003.

3.4.1 Obtención y pre-cultivo de explantes de hoja

Tras la desinfección de las semillas tal como se describe en el apartado 1.1, éstas se pusieron en medio de germinación (MG) contenido en botes de cristal. En cada transformación, se pusieron entre 15-20 semillas por bote y un total de 200-250 semillas. La incubación tuvo lugar en cámara de cultivo. Las primeras 72h se incubaron en condiciones de oscuridad y luego de pasaron a condiciones de día largo (16 h de luz y 8h de oscuridad). Al cabo de 18 días, se extrajeron los explantes de hoja. Esto se hizo separando las dos primeras hojas de la plántula y eliminando sus extremos para incrementar la superficie de infección. Los explantes de hoja se pusieron en placas de tipo Petri que contenían medio de precultivo IK 4,0/4,0 con el envés en contacto con el medio de cultivo. Se colocaron 15 explantes por placa y con el fin de evitar una evaporación excesiva las placas se sellaron con parafilm y se incubaron durante 48h usando las mismas condiciones de cultivo que las descritas en el apartado anterior.

3.4.2 Preparación del cultivo bacteriano.

Para llevar a cabo la transformación genética se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 transformada con las construcciones *35S::shRNA2ox* y *35S::amiRNA2ox1*.

A. tumefaciens se cultivó a partir de un inóculo glicerinado en medio LB sólido suplementado con los antibióticos espectinomina y rifampicina. Las colonias que crecieron en este medio se utilizaron de inóculo para un cultivo de 10 mL en medio líquido de la misma composición y se incubaron en oscuridad a 28°C durante 72 h en agitador orbital a 230 r.p.m. Posteriormente las bacterias se cultivaron en 50mL de medio líquido LB contenido en matraces en agitador orbital a 230 r.p.m. hasta alcanzar una densidad óptica de 0,2-0,3 (medida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm), que corresponde a un cultivo en fase exponencial de crecimiento y con una concentración de inóculo aproximada de 10^2 - 10^3 bacterias/mL. Este cultivo fue el empleado para realizar la inoculación de los explantes.

3.4.3 Infección y lavado.

Una vez se tuvo el cultivo bacteriano a la concentración celular adecuada y hubieran transcurrido 48 h del cultivo de los explantes se procedió a realizar el paso de infección o inoculación. El objetivo de esta fase es que la bacteria infecte el tejido vegetal y de esta forma transfiera al genoma de la planta la información genética deseada. Para ello se sumergieron los

explantes durante 8 min en el cultivo de *A. tumefaciens* obtenido previamente (50 explantos por 50 mL de cultivo de *A. tumefaciens*). Al cultivo bacteriano antes de realizar la inoculación se le añadió acetosiringona (2 mL de solución stock (100 mM) por cada litro de cultivo empleado). La acetosiringona es un compuesto fenólico, secretado por las plantas ante el ataque de algunos patógenos, que facilita la transferencia de información genética desde *A. tumefaciens* a la planta e incrementa significativamente la eficiencia del proceso de transformación (Vinoth *et al*, 2013). Tras la inoculación, se secaron los explantes sobre papel de filtro estéril y a continuación, se colocaron con el envés en contacto con el medio de cocultivo, IK 4,0/4,0 al que también se le añadió acetosiringona esterilizada por microinfiltración (Millipore 0,2 µm) a una concentración final de 200 µM. Los explantes se incubaron con el cultivo bacteriano durante 48 h en oscuridad, en cámara de cultivo. Concluido el período de cocultivo los explantes se transfirieron durante 8 min a botes estériles de cristal con aproximadamente 150 mL de medio de lavado (ML) suplementado con cefotaxima (500 mg/L) para eliminar el exceso de *A. tumefaciens*.

3.4.4 Inducción de organogénesis y desarrollo del sistema radicular

Tras el lavado, los explantes se secaron sobre papel de filtro estéril y se colocaron en placas Petri que contenían medio organogénico sin presión selectiva (IK 4,0/4,0 + cefotaxima 400 mg/L), durante 48 h en cámara de cultivo. Transcurrido este tiempo los explantes se pasaron a placas Petri con medio selectivo de inducción organogénica IKZ 4,0/4,0/1,0 y se cultivaron en cámara de cultivo de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente. Este medio de cultivo posee una combinación de reguladores que permite la formación de estructuras organogénicas como yemas, yemas-ápice y brotes. Cada 2-3 semanas aproximadamente se subcultivaron los explantes en el mismo medio IKZ 4,0/4,0/1,0. Para favorecer el desarrollo de estructuras organogénicas, en cada subcultivo se eliminaron las zonas necróticas de los callos. Conforme aparecen los brotes individuales éstos se separan del callo organogénico y se disponen en el medio de enraizamiento (ME), para permitir el desarrollo del sistema radicular y la parte aérea de la planta. Al realizar este paso se eliminan de los brotes las hojas que han crecido en ellos y estas hojas se usan para determinar el nivel de ploidía y de esta manera descartar las plantas con anomalías cromosómicas. Una vez que se han desarrollado las raíces y han aparecido una yema caulinar y varias yemas axilares, se pueden llevar las plantas a condiciones de invernadero.

3.4.5 Aclimatación en condiciones de invernadero

Después de 3-4 semanas de la colocación de los brotes en el medio de enraizamiento aproximadamente, las plantas se encuentran en el estadio adecuado para su aclimatación. Se sacaron de los botes de cultivo y se lavaron las raíces para eliminar los restos de agar, procurando no dañarlas. Después se trasplantaron a macetas con tierra y se cubrieron con vasos

de plástico para mantener las condiciones de humedad. Transcurridas dos semanas desde su transplante se retira el vaso progresivamente hasta completar su correcta aclimatación.

4. Análisis de plantas transgénicas

4.1. Evaluación del nivel de ploidía

La determinación de los niveles de ploidía se realizó por citometría de flujo mediante la cuantificación del contenido de DNA nuclear de las células de hojas jóvenes procedente de transformantes primarios cultivados en medio de inducción de organogénesis (IKZ 4,0/4,0/1,0), según el método de Smulders *et al*, 1994. El tejido se colocó en una placa tipo Petri a la que se añadieron 200 μ L de tampón de extracción de núcleos (Partec) y se troceó finamente. Una vez troceado, el suspendido resultante se pasó a través de una malla de nylon de 50 μ m, y, se le añadieron 800 μ L de una solución colorante que contenía 1 mg/L de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec), consiguiendo así la tinción fluorescente del DNA. El DNA de los núcleos aislados se midió utilizando un citómetro de flujo Partec PAS-II Ploidy Analyser. El resultado apareció representado en un gráfico que ordenó los datos según el contenido nuclear de DNA (en el eje de abcisas) y contabilizó el número de núcleos de cada tipo (en el eje de ordenadas). Para calibrarlo se utilizó el pico correspondiente a un contenido de DNA igual a 2C (diploide) de plantas control.

4.2. Segregación del gen *nptII* en la primera generación de plantas transgénicas (TG1)

El gen bacteriano *nptII* de *Escherichia coli* codifica para el enzima neomicina fosfotransferasa que inactiva por fosforilación a los antibióticos de tipo aminoglicósidos como la kanamicina, neomicina y gentamicina. La expresión de las construcciones *35S::shRNA2ox* y *35S::amiRNA2ox1*, portadoras del gen *nptII* (Figura M.5), confieren resistencia a estos antibióticos, que son tóxicos para las células vegetales. La selección en un medio con kanamicina proporciona un método eficaz de selección del material vegetal transformado.

Se pusieron 60 semillas por línea en medio de germinación (MG) sin presión selectiva y luego de 7-10 días se tomaron las plántulas que tuvieran un desarrollo normal, se les cortó la raíz completamente y se pasaron a medio de germinación suplementado con kanamicina a una concentración de 100 mg/L. Al cabo de 7-15 días se analiza la proporción de plantas resistentes (aquellas que han regenerado la raíz) y las sensibles (aquellas que no han regenerado la raíz) usando un test de χ^2 para conocer el número de loci del transgén en las plantas transgénicas obtenidas. Se consideró significativo con una $p \leq 0.10$.

4.3. Genotipado plantas *35S::amiRNA2ox1* en la primera generación de plantas transgénicas (TG1)

Para conocer cuales plantas, de las aclimatadas en condiciones de invernadero, portaban el transgén *35S::amiRNA2ox1* se extrajo el DNA genómico a partir de hojas tal como se describe en el apartado 2.3.2. Añadimos este DNA como molde en la siguiente reacción de PCR: Buffer Green GoTaq Flexi DNA Polymerase 1X, MgCl₂ 1.0mM, mezcla de dNTPs 0.2mM, cebadores (attB1*amiRNA2ox1* y attB2*amiRNA2ox1*) 0.5μM cada uno, GoTaq Flexi DNA Polymerase 1.25U. El volumen final de reacción fue 25μL y el programa es el que se detalla en la tabla M.5.

Tabla M.5. Programa de PCR empleados el genotipado de las plantas transgénicas *35S::amiRNA2ox1* en la TG1. Se empleó un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a 95°C y para la extensión final una temperatura de 72°C durante 5 minutos

DESNATURALIZACIÓN		HIBRIDACIÓN		EXTENSIÓN		
TEMP (°C)	t	TEMP (°C)	t	TEMP (°C)	t	CICLOS
95	45s	60	45s	72	1 min	25

Usamos como control negativo el DNA genómico de las plantas silvestres y como control positivo el plásmido pK2GW7 con el fragmento *amiRNA2ox1* insertado.

4.4. Evaluación de caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo en las plantas transgénicas

Para determinar los efectos fenotípicos de los transgenes introducidos en las plantas transgénicas evaluamos varios caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas. En todos los experimentos se empleó como control la planta silvestre sin transformar.

- **Desarrollo vegetativo:**
 - Germinación.
 - Longitud de hipocotilos y raíces en plántulas.
 - Número de hojas hasta la primera inflorescencia.
 - Altura total, medida desde los cotiledones a la axila de la hoja terminal (hoja donde aparece la inflorescencia terminal).
 - Longitud de entrenudo, correspondiente a la longitud del quinto entrenudo.
 - Área de hoja, correspondiente a la quinta hoja (Longitud *Anchura máxima de hoja).
 - Número de foliolos, correspondiente a la quinta hoja.
 - Hábito de crecimiento y patrón de ramificación.
 - Peso fresco de raíz, tomado en plantas adultas de 90 días.

- **Desarrollo reproductivo:**
 - Número de flores por inflorescencia (en las dos primeras inflorescencias).
 - Tiempo de floración, medido por el número de días que transcurren desde la puesta en invernadero de la planta hasta que la primera flor de la planta llega a la antesis.
 - Tiempo de maduración de frutos, medido por el número de días que transcurren desde la puesta en invernadero de la planta hasta que el primer fruto de la planta alcanza la madurez (color rojo).
 - Número de frutos por planta.
 - Peso frutos.
 - Número de lóculos y semillas por fruto.
 - °Brix.
 - Capacidad partenocárpica.

4. 4. 1 Germinación

Se tomaron 60 semillas de cada línea transgénica y del silvestre y se pusieron sobre tres capas de papel de filtro Whatman No. 1 (Fisher) en placas Petri. Se colocaron 20 semillas por placa y se añadieron aproximadamente 5mL de agua desionizada. Las cajas Petri se sellaron con parafilm para evitar la evaporación del agua y se pusieron en cámara de cultivo en condiciones de día largo (16h de luz/8h oscuridad) a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. En el caso de las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* se usaron tres lotes diferentes de semillas para cada línea analizada. Las semillas se consideraron germinadas cuando se observaba claramente la salida de la radícula de la testa.

4. 4. 2 Longitud de hipocotilos y raíces de plántulas

Se pusieron al menos 20 semillas de cada línea analizada en botes que contenían MG y se cultivaron en cámara de cultivo ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; 16h de luz/8h oscuridad). Al cabo de 7 días (*35S::shRNA2ox*) o 11 días (*35S::amiRNA2ox1*) las plántulas se fotografiaron sobre papel milimetrado. Posteriormente se midieron los hipocotilos y la raíz principal usando el programa ImageJ (National Institutes of Health, USA).

4. 4. 3 Hábito de crecimiento y patrón de ramificación

Se cultivaron las plantas en condiciones de invernadero y de forma periódica se observó la aparición de ramas laterales, en las axilas que quedan por debajo del Brote Simpodial (BS) (Figura I.8B). Se consideraron como ramificadas aquellas axilas en las cuales aparecía un brote $\geq 0.5\text{cm}$, tal como se muestra en la Figura M.6.



Figura M.6. Axila ramificada. En la figura aparece señalado un brote lateral de 0.5cm de longitud. En todas las axilas donde hubiese crecido un brote ≥ 0.5 cm, se consideró como ramificada.

El parámetro que comparamos entre las diferentes líneas fue el porcentaje de axilas ramificadas, también referido como porcentaje de ramificación y fue calculado, en cada planta, de la siguiente manera:

$$\% \text{ Ramificación} = (\text{N}^\circ \text{ axilas ramificadas} / \text{N}^\circ \text{ total de axilas}) * 100.$$

Donde:

Nº total de axilas = Nº axilas hasta la primera inflorescencia – 2 (A efectos de este análisis no se tuvo en cuenta la axila donde aparece la inflorescencia terminal ni la axila posterior)

Nº axilas ramificadas: Axilas donde ha aparecido un brote ≥ 0.5 cm.

A partir de los valores obtenidos por planta se obtuvieron los promedios por línea (empleando un mínimo de 10 plantas por línea). Las líneas empleadas en este análisis y sus genotipos se detallan en la Tabla M.6.

Tabla M.6. Líneas empleadas y sus genotipos en los análisis del patrón de ramificación.

Línea	Genotipo
L1	Líneas transgénicas 35S:: <i>shRNA2ox</i> . Silenciamiento genes de enzimas catabólicos GA2ox
L5	
L19	Línea transgénica 35S:: <i>CcGA20ox1</i> . Sobre-expresión gen de enzima de biosíntesis GA20ox1 (García-Hurtado <i>et al</i> , 2012)
procera	Mutante <i>SIDELLA</i> . Pérdida de función de proteína DELLA. Activación constitutiva de vía de respuesta a GAs (Bassel <i>et al</i> , 2008; Carrera <i>et al</i> , 2012)
MT	Cultivar Micro-Tom. Crecimiento determinado, deficiencia brasinosteroides (mutación alelo <i>d</i>) (Martí <i>et al</i> , 2006)
MT-D	Línea isogénica de MT con alelo <i>D</i> silvestre. Crecimiento determinado. No presenta deficiencia de brasinosteroides (Carvalho <i>et al</i> , 2011)
L1-D	Híbridos F1 líneas transgénicas 35S:: <i>shRNA2ox</i> L1 y L5 con MT-D. Silenciamiento de genes de enzimas catabólicas <i>SIGA2ox</i> y genotipo <i>Dd</i> para brasinosteroides.
L5-D	
L11	Líneas transgénica 35S:: <i>amiRNA2ox1</i> . Silenciamiento gen del enzima catabólica GA2ox1
L12	
L13	

4. 4. 4 Análisis del desarrollo de ovarios

En este trabajo se analizaron diferentes estadios del desarrollo de los ovarios de las líneas transgénicas y el silvestre, desde dos días antes de la antesis hasta 20 días después de la misma, emasculados y polinizados. En este análisis solamente se usaron 3 flores por inflorescencia de las 4 primeras inflorescencias de la planta y el resto de las flores de la inflorescencia fueron eliminadas. Dos días antes de la antesis se emascularon las flores para evitar la autopolinización. Esto se hizo eliminando el cono estaminal con pinzas, dejando intactos los sépalos y el pistilo. En el caso de los ovarios polinizados, dos días después de emasculados se polinizaron manualmente. En cada estadio analizado los ovarios se pesaron individualmente.

4. 4. 5 Contenido en sólidos solubles (°Brix)

La determinación de los sólidos solubles (°Brix) se realizó mediante refractometría, estimando el índice de refracción (IR) con un refractómetro de mano (ATAGO N-14) (Figura M.7), el cual compara la velocidad de la luz que pasa a través de un líquido, con la velocidad a la cual pasa a través del aire. Este análisis se realizó en frutos en el estadio de rojo maduro. Para determinar este estadio del fruto, se seleccionaron frutos que hubieran alcanzado el color naranja y se marcaron con una etiqueta colgante. A partir de este momento se siguió su desarrollo hasta que alcanzó el color rojo. Una vez llegado al estadio esperado se recogieron los frutos y se exprimieron manualmente para extraer el jugo. El refractómetro se calibró con agua destilada y, posteriormente se colocó una gota del jugo extraído sobre el prisma del refractómetro, se cerró la tapa (de manera que la gota quedó extendida homogéneamente por todo el prisma) y, enfocando el refractómetro hacia un foco de luz, se observó un círculo con una escala cuya parte superior es de color azul y la inferior blanca. El valor que se anotó fue el correspondiente a la división de la escala más próxima a la línea que separa los dos colores. La unidad de dichas medidas serán los °Brix, equivalentes al porcentaje en sólidos solubles.



Figura M.7. Refractómetro de mano ATAGO

4. 5. Cuantificación de niveles de giberelinas en las plantas transgénicas

Para conocer como regulan los enzimas GA2ox los niveles de GAs en la planta cuantificamos varias GAs de la ruta biosintética en las plantas transgénicas y el silvestre. Como tejidos vegetativos en las líneas transgénicas *35S::shRNA2ox* escogimos la porción apical, tallos y

axilas laterales de plantas adultas. Se emplearon plantas adultas en floración, pero antes de llegar a la antesis y en las cuales la mayor flor de la inflorescencia no fuera mayor de 4mm. En la muestra de tallo se eliminaron las hojas y se dejó intacta una pequeña parte del peciolo (donde está la yema axilar). La muestra de porción apical estaba formada por las tres hojas más jóvenes y para este análisis se eliminaron las flores. La muestra de axilas laterales se tomó de plantas adultas de 27 días, en las cuales no se observaba un desarrollo visible de la yema axilar y se tomó por separado de las axilas tercera, cuarta y quinta eliminando la mayor cantidad de tejido posible proveniente del tallo y el peciolo de la hoja. En la muestra de tallo usamos tres réplicas biológicas de la línea transgénica L1 y del silvestre de, 3 plantas cada una. En la muestra de porción apical usamos 7 réplicas biológicas de 5 plantas cada una para las plantas silvestres y de la línea L1, 4 réplicas biológicas también de 5 plantas cada una. Para las muestras de axilas se usaron igualmente tres réplicas biológicas de 15 plantas cada una para el silvestre y la línea L1.

Como tejido reproductivo en las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* y *35S::amiRNA2ox1* empleamos ovarios polinizados manualmente de 10 días de edad. Para los ovarios de las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* usamos 5 réplicas biológicas de 4 ovarios cada una para el silvestre y las líneas transgénicas L1 y L5. En la muestra de ovarios de las líneas *35S::amiRNA2ox1* empleamos 3 réplicas biológicas de las líneas L11, L12, L13 y silvestre, de 10 ovarios cada una.

El material vegetal se congeló luego de su recolección con nitrógeno líquido y se trituró con ayuda de un mortero. Se emplearon dos procesos diferentes para la extracción y purificación. Las muestras de ovarios y porción apical de las líneas transgénicas *35S::shRNA2ox* se extrajeron y purificaron de acuerdo al protocolo 1 (Figura M.8, Tabla M.7) empleando 100mg del tejido previamente triturado y una mezcla de GAs deuteradas que se usan como estándares internos (([17, 17-²H]GA₁, [17, 17-²H]GA₄, [17, 17-²H]GA₈, [17, 17-²H]GA₉, [17, 17-²H]GA₁₉, [17, 17-²H]GA₂₀, [17, 17-²H]GA₂₉, [17, 17-²H]GA₃₄ y [17, 17-²H]GA₄₄).

Al pellet obtenido en el paso 3 de la fase de extracción se le adicionó Metanol 80% (v/v) nuevamente y se incubó 15 minutos en agitación a 4°C (Figura M.8). Transcurrido este tiempo se centrifugó a 12 000 r.p.m durante 10 minutos a 4°C y se pasó el sobrenadante a un tubo fresco. Este procedimiento se volvió a repetir una vez más. Los sobrenadantes obtenidos se juntaron para pasar a la fase de purificación como se muestra en la Figura M.8. Luego de la elución de la columna C₁₈ (Figura M.8, Tabla M.7), los extractos vegetales disueltos en Metanol 80% (v/v) se llevaron a sequedad usando un speed-vac y se resuspendieron en 0.2mL de 2-propanol. La cuantificación se realizó usando Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masas (GC-MS). Para facilitar el análisis de las muestras usando este método éstas se derivatizaron. Primero se metilaron dejando las muestras en una mezcla de Trimetilsilil-

diazometano/ hexano durante toda la noche. Posteriormente se llevaron nuevamente a sequedad usando un speed-vac y luego se resuspendieron en una mezcla 1:1 de Piridina y BSTFA (1% TCMS (N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida). El análisis de las muestras se llevó a cabo usando el cromatógrafo de gases 7890A acoplado al espectrómetro de masas 7000-QQQ de Agilent Technologies. La cuantificación se hizo por dilución isotópica, empleando el software MassHunter Quantitative también de Agilent Technologies.

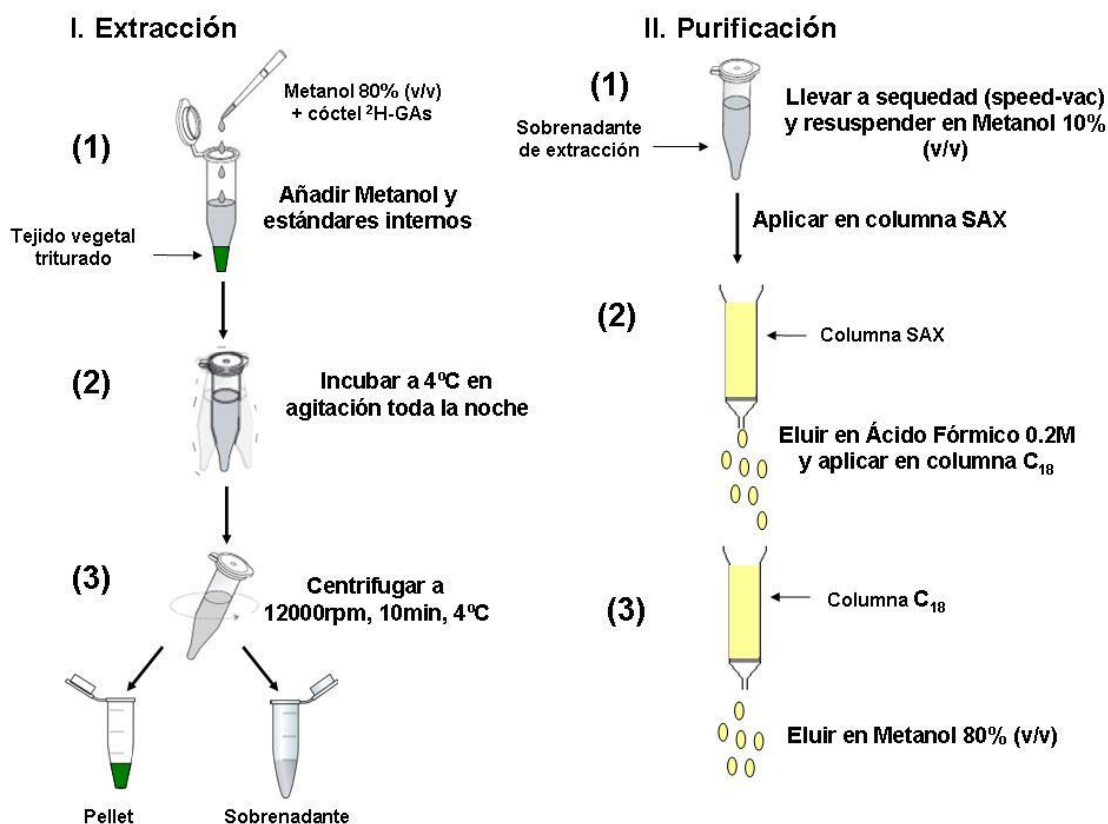


Figura M.8. Esquema de proceso de extracción y purificación de GAs a partir de tejidos vegetativos (porción apical) y reproductivos (ovarios de 10 días polinizados manualmente) de líneas transgénicas *35S::shRNA2ox* y silvestre.

Las muestras de tallos y axilas de las líneas transgénicas *35S::shRNA2ox* y los ovarios de las líneas transgénicas *35S::amiRNA2ox1* se extrajeron de acuerdo al protocolo 2 (Figura M.9, Tabla M.7), empleando igualmente 100mg del tejido previamente triturado y una mezcla de GAs deuteradas que se usan como estándares internos ([17, 17-²H]GA₁, [17, 17-²H]GA₄, [17, 17-²H]GA₈, [17, 17-²H]GA₉, [17, 17-²H]GA₁₂, [17, 17-²H]GA₁₅, [17, 17-²H]GA₁₉, [17, 17-²H]GA₂₀, [17, 17-²H]GA₂₄, [17, 17-²H]GA₂₉, [17, 17-²H]GA₅₁, [17, 17-²H]GA₅₃ y [17, 17-²H]GA₄₄). En este protocolo al pellet obtenido en el paso 3 de la fase de extracción se le adicionó nuevamente Metanol 80%-Ácido Acético 1% (v/v) y se incubó 10 minutos en agitación a 4°C (Figura M.9). Transcurrido este tiempo se centrifugó a 12 000 r.p.m durante 10 minutos a 4°C y se pasó el sobrenadante a un tubo fresco. Este sobrenadante se juntó con el obtenido anteriormente y con ellos se pasó a la fase de purificación.

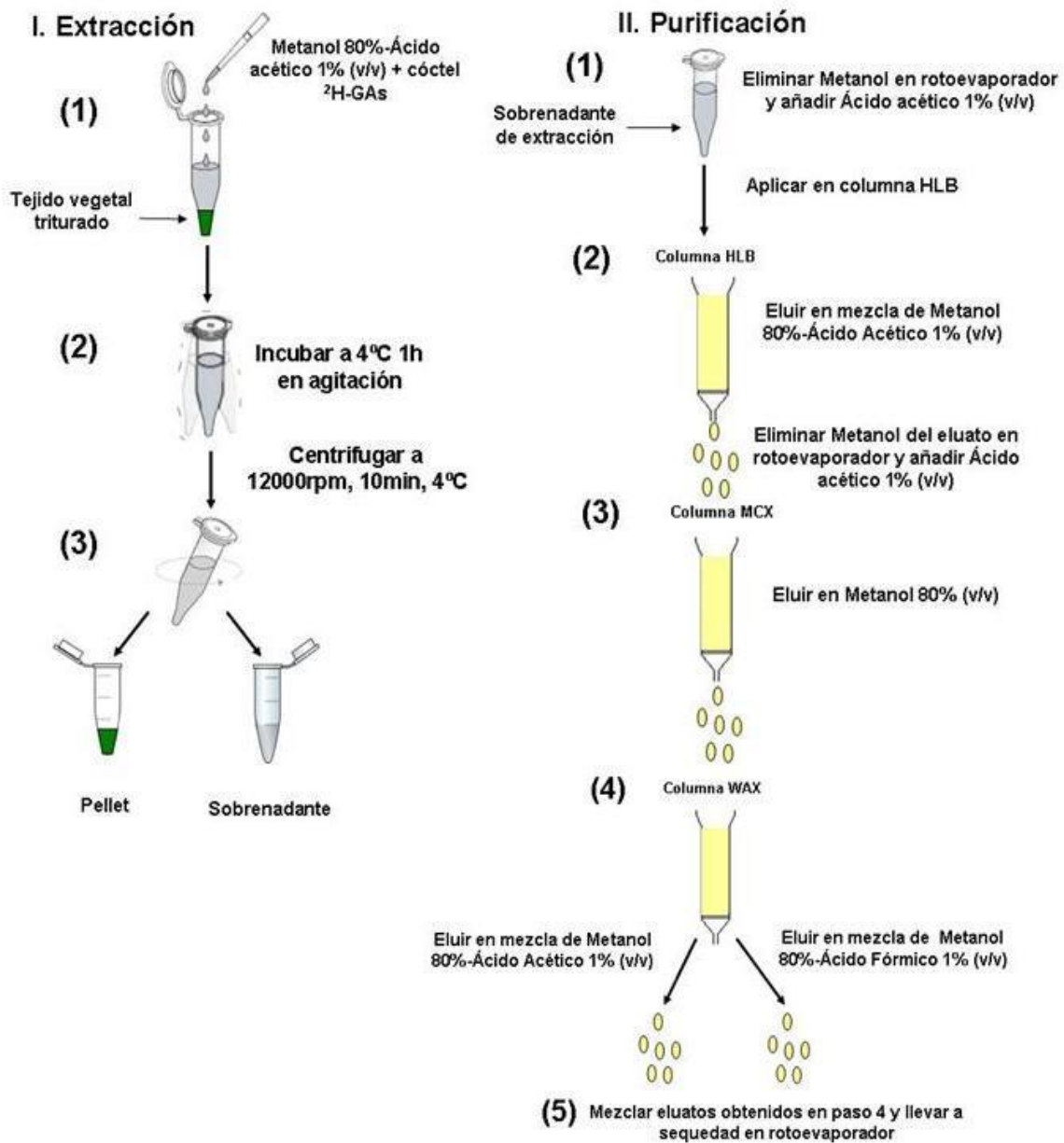


Figura M.9. Esquema de proceso de extracción y purificación de GAs a partir de porciones de tallo y yemas laterales de plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* y ovarios polinizados manualmente de 10 días de líneas transgénicas *35S::samiRNA1* y silvestre.

Luego de la elución de la columna WAX (Figura M.9, Tabla M.7), los extractos vegetales se llevaron a sequedad usando un speed-vac y se resuspendieron en una mezcla de Acetonitrilo 5%-Ácido Acético 1% (v/v). En este caso la cuantificación se realizó usando un Espectrómetro de Masas acoplado a Cromatografía Líquida de Alta Presión (LC-MS-MS), usando el equipo Q-Exactive de Thermo Fisher. La cuantificación se hizo también por dilución isotópica, empleando el software Qual Browser también de Thermo Fisher.

Tabla M.7. Características de las cromatografías líquidas realizadas durante la fase de purificación de GAs a partir de tejidos vegetativos (porción apical, porciones de tallo y yemas axilares) y reproductivos (ovarios polinizados manualmente de 10 días) de las líneas transgénicas *35S::shRNA2ox*, *35S::amiRNA2ox1* y silvestre.

COLUMNA	MUESTRAS	PASOS CROMATOGRAFÍA			
		Equilibrar	Aplicación muestra	Lavado	Elución
SAX	Porción apical y ovarios polinizados manualmente líneas <i>35S::shRNA2ox</i>	Metanol 100% H ₂ O pH 8,0	Metanol 80% (v/v)	H ₂ O pH 8,0	Ácido fórmico 0,2 M
C ₁₈		Metanol 100% H ₂ O pH 3,0	Ácido fórmico 0,2 M	H ₂ O pH 3,0	Metanol 80% (v/v)
Oasis HLB	Porciones de tallo transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i> Ovarios polinizados manualmente líneas <i>35S::amiRNA2ox1</i>	Acetonitrilo Metanol 100% Ácido Acético 1% (v/v)	Ácido Acético 1% (v/v)	Ácido Acético 1% (v/v)	Metanol 80%-Ácido Acético 1% (v/v)
Oasis MCX		Acetonitrilo Metanol 100% HCl 0,1M Ácido Acético 1% (v/v)	Ácido Acético 1% (v/v)	Ácido Acético 1% (v/v)	Metanol 100% (v/v)
Oasis WAX		Acetonitrilo Metanol 100% NaOH 0,1M Ácido Acético 1% (v/v)	Ácido Acético 1% (v/v)	Ácido Acético 1% (v/v)	Metanol 80%-Ácido Acético 1% (v/v) Metanol 80%-Ácido Fórmico 1% (v/v)

5. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos durante el transcurso de este trabajo fueron analizados usando el software SPSS v16.0 para Windows. Cuando se analizaron más de tres grupos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y para las pruebas de rango post-hoc se usaron las Prueba de Tukey y de Bonferroni, considerando una $P < 0.05$. Cuando se analizaron dos grupos se empleó un test t de Student también considerando una $P < 0.05$. Para el análisis de homogeneidad de varianzas se empleó el estadístico de Levene.

***CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA FAMILIA
SIGA2ox EN TOMATE***

RESULTADOS I

1. Patrón de expresión de genes *SIGA2ox*

En tomate (*Solanum lycopersicum* L.), se han descrito 5 genes que codifican para enzimas GA2ox (*Serrani et al, 2007a*). El análisis de la expresión de estos genes por RT-qPCR mostró que todos ellos se expresan tanto en tejidos vegetativos como reproductivos aunque los niveles de expresión varían grandemente, incluso hasta en 5 órdenes de magnitud, de acuerdo al tejido y al estadio analizado (Figura RI.1). El gen cuya expresión es más variable entre los tejidos analizados es el gen *SIGA2ox1*, siendo más abundante en ovarios que en tejidos vegetativos. El máximo valor de expresión de este gen se detectó en ovarios emasculados de 5 días al igual que los genes *SIGA2ox2* y *SIGA2ox5*. Los genes *SIGA2ox3*, *SIGA2ox4* y *SIGA2ox5* son los más abundantes en tejidos vegetativos. El mayor valor de expresión detectada de los genes *SIGA2ox3* y *SIGA2ox4*, a diferencia de los otros genes, se detectó en raíz.

Estos resultados muestran que existe solapamiento en la expresión de los genes *SIGA2ox* en todos los tejidos de tomate. Esto sugiere que, al igual que sucede en otras especies, como *A.thaliana* puede existir redundancia funcional entre ellos (*Rieu et al, 2008*). De todos los tejidos analizados, en dos de ellos no se aprecian grandes diferencias de expresión entre los genes *SIGA2ox*: en la porción apical de plantas adultas y en ovarios al momento de la antesis. Existe, sin embargo una diferencia considerable en los niveles de mensajeros entre estos tejidos, siendo más abundantes en los ovarios en antesis.

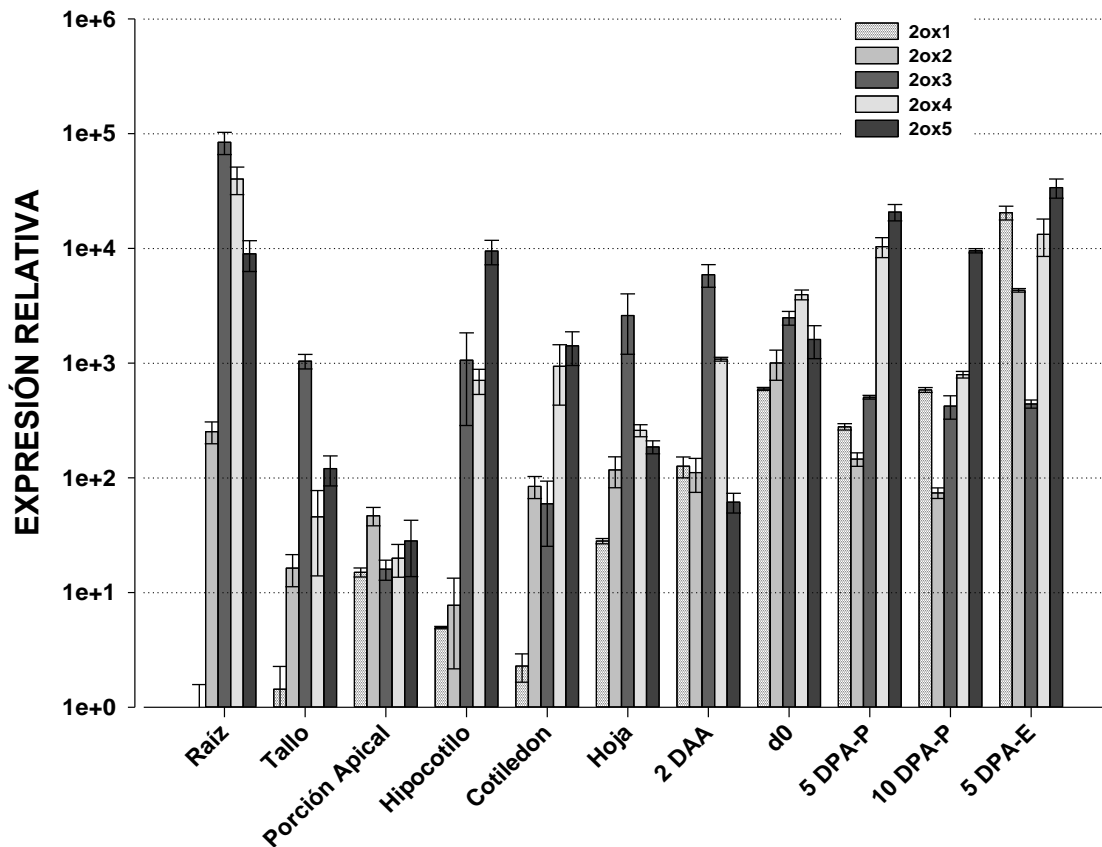


Figura RI.1. Abundancia relativa de transcritos de los genes *SIGA2ox* en tejidos vegetativos y reproductivos de tomate cv Micro-Tom. Los tejidos vegetativos analizados son: raíz de plantas adultas (90 días), tallo y porción apical de plantas jóvenes adultas (antes de la antesis), hipocotilos y cotiledones de plántulas de 13 días y hojas de plantas adultas (90 días). Los tejidos reproductivos analizados son: ovarios 2 días antes de la antesis (2DAA), ovarios de flores en antesis (d0), ovarios de 5 (5DPA-P) y 10 días post-antesis (10DPA-P) polinizados y ovarios de 5 días post-antesis emasculados (5DPA-E). Los valores de expresión se refieren al valor de expresión del gen *SIGA2ox1* en raíz (1.0) y son resultado de la media de tres réplicas biológicas \pm SE.

2. Patrón de expresión de genes *SIGA2ox* en ovarios

Un aspecto muy importante en el desarrollo reproductivo de la planta es la formación y cuajado de los frutos. Es conocido que este proceso está regulado de manera positiva por GAs (Gillaspy *et al*, 1993) y que tras la fertilización se produce un incremento significativo de los niveles endógenos de GAs activas en el ovario (Bonher *et al*, 1988; Koshioka *et al*, 1994). Dado que se sabe que las GA2oxs son importantes en la regulación de los niveles de GAs, comparamos el patrón de expresión de los genes *SIGA2ox* entre ovarios polinizados y no polinizados.

Tal y como se aprecia en la figura RI.2A, donde se muestra la evolución del peso de los ovarios, desde el día -2 hasta el día de antesis (0) hay un pequeño incremento en el tamaño del ovario. Luego de la antesis, mientras que los ovarios emasculados no crecen, los ovarios polinizados comienzan rápidamente su crecimiento y en solo 5 días llegan a ser hasta 10 veces más grandes que los ovarios no polinizados. La expresión de los genes *SIGA2ox*, a excepción del gen *SIGA2ox3*, aumenta del día -2 al 0 (Figura RI.2B-F). Luego de la antesis solamente dos de ellos se expresan de forma distinta en ovarios polinizados y no polinizados: *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2*.

En los ovarios polinizados, que son órganos en crecimiento, disminuyen los niveles de expresión de los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2*. En cambio en los ovarios emasculados, que no crecen, la expresión de *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2* aumenta de manera significativa. En el caso del gen *SIGA2ox2* su expresión aumenta unas 4 veces y el gen *SIGA2ox1* aumenta más de 30 veces, respecto al día de antesis. El gen *SIGA2ox3* disminuye su expresión significativamente, luego de la antesis tanto en ovarios polinizados como emasculados. La expresión de los genes *SIGA2ox4* y *SIGA2ox5* aumenta luego del día de antesis por igual en ovarios polinizados y emasculados.

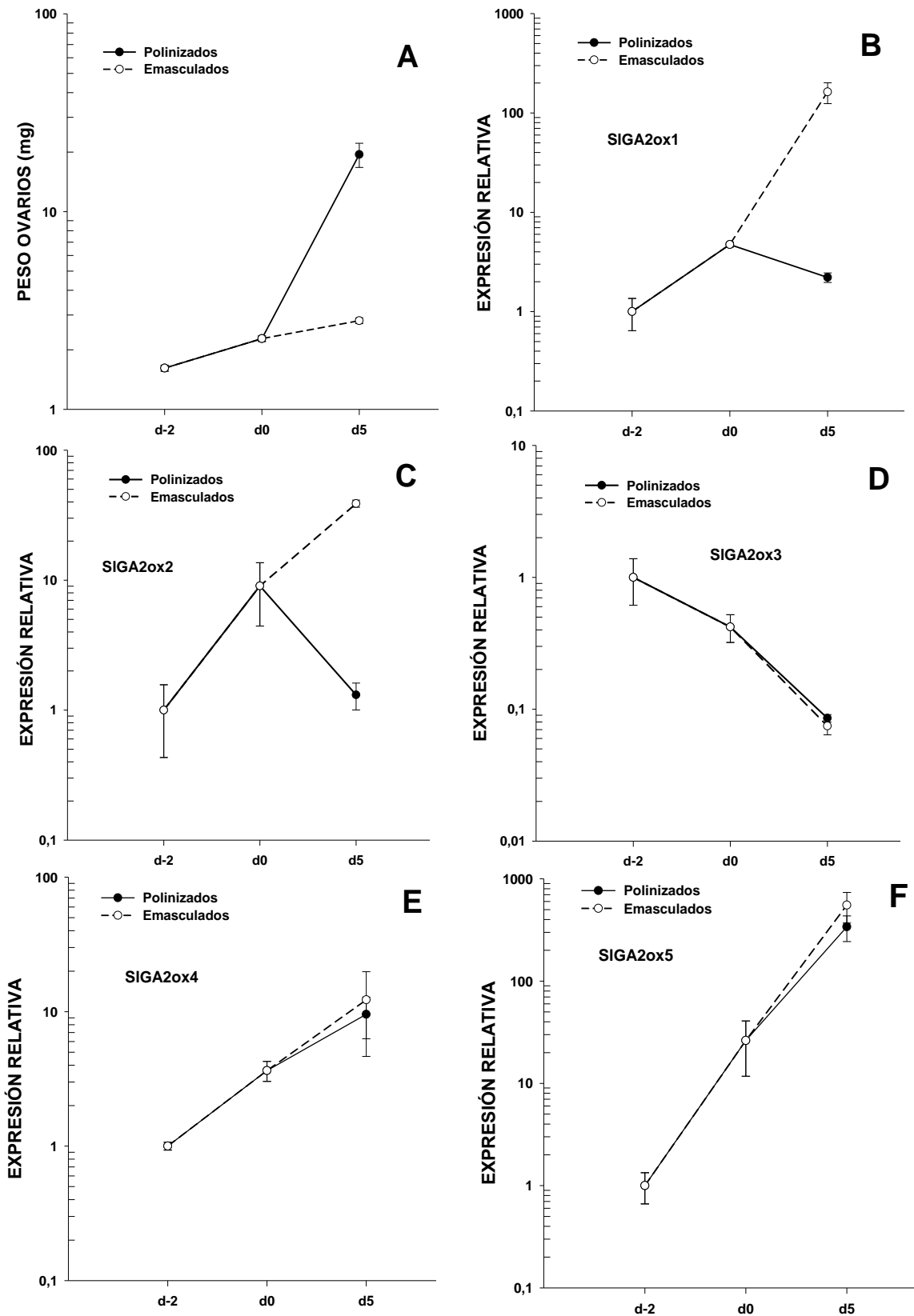


Figura RI.2. Evolución temporal del desarrollo de ovarios polinizados y emasculados de tomate (cv Micro-Tom) y la expresión de genes *SIGA2ox* desde 2 días (d-2) antes de la antesis (d0) hasta 5 días después de la antesis (d5). Los valores de expresión están referidos al valor de expresión de cada gen en d-2 (1.0) y son el resultado de la media de tres réplicas biológicas \pm STD. A: Desarrollo ovarios polinizados y emasculados; B: *SIGA2ox1*; C: *SIGA2ox2*; D: *SIGA2ox3*; E: *SIGA2ox4*; F: *SIGA2ox5*.

3. Regulación por retroalimentación de genes *SIGA2ox*

Se ha descrito un mecanismo de retroalimentación negativa en el caso de los genes biosintéticos *GA20ox* y *GA3ox*, y positiva en el caso de los genes *GA2ox* para regular la expresión de los genes del metabolismo de GAs (Hedden y Thomas, 2012).

Para estudiar la regulación por retroalimentación de los genes *SIGA2ox* cultivamos plántulas en presencia del inhibidor de biosíntesis de GAs paclobutrazol (PCB) y de la giberelina activa GA_3 (ácido giberélico) durante 13 días y posteriormente analizamos la expresión de los genes *SIGA2ox* en hipocotilos. A modo de control también medimos la expresión del gen de biosíntesis *SIGA20ox1*, el cual en trabajos anteriores había mostrado regulación por retroalimentación negativa (Martí *et al*, 2010). Los hipocotilos de las plántulas cultivadas en presencia de PCB resultaron más cortos y los de las plántulas cultivadas en presencia de GA_3 fueron significativamente más largos que los de las plántulas no tratadas (Figura RI.3A), tal como se espera al reducir el contenido endógeno de GAs con el PCB y aumentarlos con GA_3 . Al analizar la expresión de los genes *SIGA2ox* en los hipocotilos observamos que la expresión de ninguno de los genes *SIGA2ox*, excepto los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox5*, mostraba cambios significativos en respuesta a las variaciones en los niveles de GAs. Sorprendentemente, detectamos un aumento significativo de hasta 3 veces en la expresión del gen *SIGA2ox1* en las plántulas tratadas con PCB respecto a las plántulas no tratadas (Figura RI.3B) pero no observamos diferencias significativas en su expresión entre las plántulas tratadas con GA_3 y las no tratadas. En el caso del gen *SIGA2ox5* solo se detectaban diferencias significativas entre los dos tratamientos pero no entre las plántulas tratadas y las plántulas control. Tampoco encontramos diferencias en la expresión del gen de biosíntesis *SIGA20ox1* en ninguno de los tratamientos, en contradicción con lo reportado anteriormente por Martí *et al*, 2010.

Repetimos el experimento (experimento 2) usando las mismas condiciones pero en este caso, además de los hipocotilos, analizamos la expresión de los genes *SIGA2ox* en la porción apical de las plántulas, conteniendo el ápice y los cotiledones. La respuesta fenotípica de los hipocotilos fue igual a la del experimento anterior (experimento 1), confirmando la efectividad de estas dosis en la modificación de los contenidos endógenos de GAs (Figura RI.3C). En este segundo experimento la expresión, en hipocotilos, de los genes *SIGA2ox* y el gen *SIGA20ox1* mostró un comportamiento similar al del experimento anterior. También en este caso observamos un incremento significativo en la expresión del gen *SIGA2ox1* en las plántulas tratadas con PCB (Figura RI.3D), mientras que en la expresión de los otros genes *SIGA2ox* no se observaron diferencias en respuesta a ninguno de los tratamientos. En la expresión del gen *SIGA20ox1* no se detectaron alteraciones significativas entre las plántulas tratadas y las plántulas control pero sí se detectaron diferencias significativas al comparar los tratamientos entre sí.

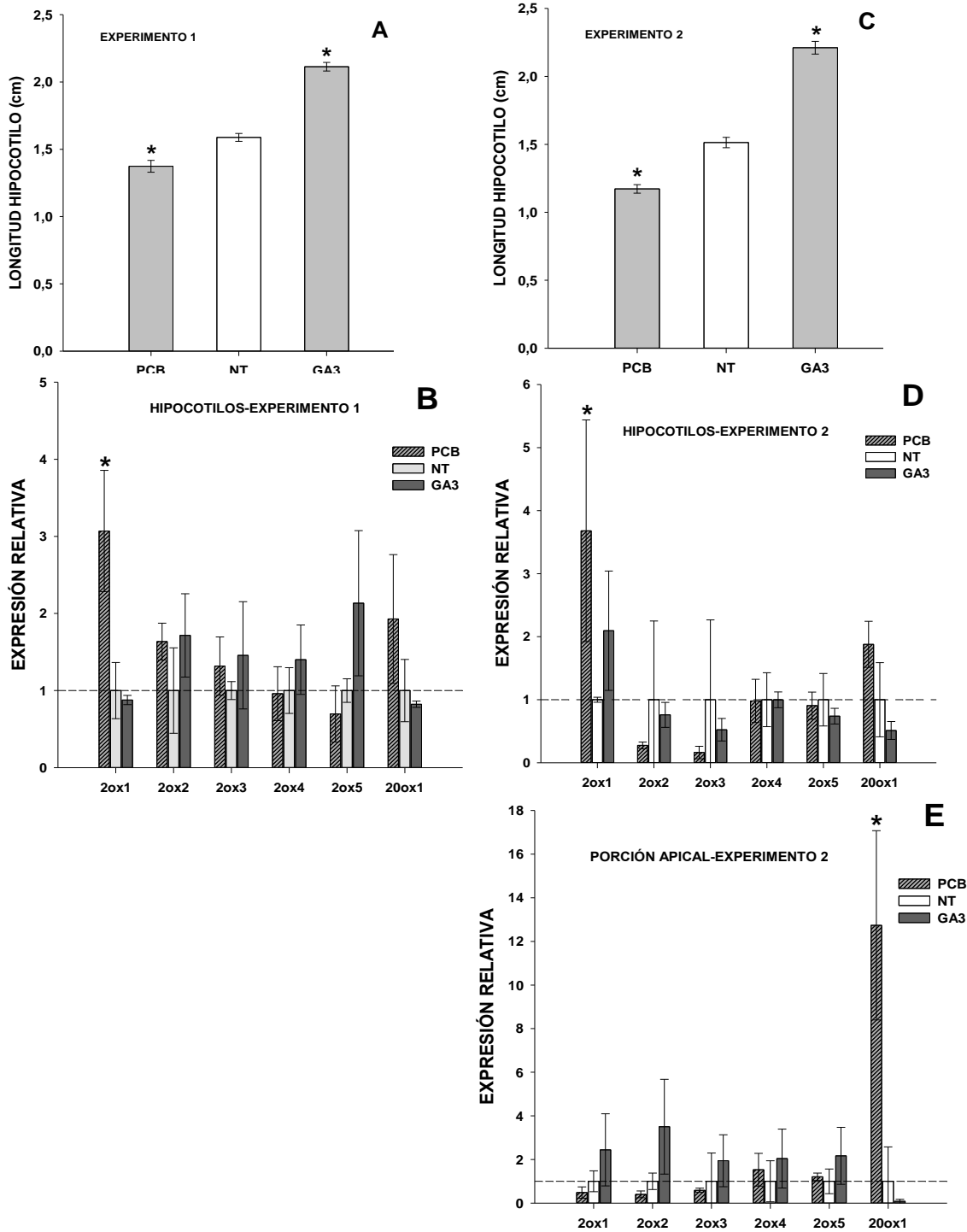


Figura RI.3. Expresión de genes *SIGA2ox* y *SIGA20ox1* en respuesta a cambios en las concentraciones endógenas de GAs activas (PCB $10^{-7}M$; GA_3 $10^{-5}M$). Estos datos corresponden a dos experimentos independientes. En el primer experimento (experimento 1) solamente se analizó la expresión de los genes en los hipocotilos y en el segundo experimento (experimento 2) se analizó la expresión en hipocotilos y porción apical. A: Longitud de hipocotilos experimento 1; B: Expresión de genes *SIGA2ox* y *SIGA20ox1* en hipocotilos experimento 1; C: Longitud de hipocotilos experimento 2; D: Expresión de genes *SIGA2ox* y *SIGA20ox1* en hipocotilos experimento 2; E: Expresión de genes *SIGA2ox* y *SIGA20ox1* en porción apical experimento 2. Los valores de expresión son relativos a las plantas no tratadas (NT=1.0) y son resultado de la media de tres réplicas biológicas \pm STD

*, significativamente diferente de las plantas no tratadas ($P < 0.05$).

En cambio, en la porción apical la expresión del gen *SIGA20ox1* mostró el comportamiento esperado, se observó un incremento significativo de hasta 10 veces en las plántulas tratadas con PCB, mientras que en las plántulas tratadas con GA₃ su expresión resultó casi indetectable (Figura RI.3E). Una vez más no se detectaron diferencias en la expresión de los genes *SIGA2ox* ante variaciones en las concentraciones de GAs. En el caso del gen *SIGA2ox1*, a diferencia de lo que ocurre en los hipocotilos, no se observa inducción de su expresión en plántulas tratadas con PCB. Tampoco se observó un incremento significativo de su expresión al tratar con GA₃, aunque al comparar los tratamientos sí que se observaron diferencias significativas.

DISCUSIÓN I.

1. Patrón de expresión de genes *SIGA2ox*

Los enzimas GA2ox son enzimas 2ODD que catalizan la adición de un grupo hidroxilo (-OH) a las GAs activas convirtiéndolas en inactivas. Estos enzimas están codificadas por pequeñas familias multigénicas y en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), se han descrito 5 genes que codifican para enzimas GA2ox (Serrani *et al*, 2007a).

Al analizar el patrón de expresión de estos genes en la planta observamos que tanto en tejidos vegetativos como reproductivos podían detectarse los transcritos de los genes *SIGA2ox* y en cada uno de los estadios analizados puede verse la expresión de más de 3 genes dentro de un mismo tejido (Figura RI.1). Esto indica que la expresión de los genes *SIGA2ox* es redundante y por tanto sugiere que pudiera existir redundancia funcional.

Los genes más representados en la planta son *SIGA2ox3*, *SIGA2ox4* y *SIGA2ox5*. Los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2* son poco abundantes en tejidos vegetativos pero en cambio se encuentran muy representados en los ovarios. El gen cuya expresión resultó más variable entre tejidos fue *SIGA2ox1*, siendo unas 100 veces más abundante en ovarios que en tejidos vegetativos.

2. Patrón de expresión de genes *SIGA2ox* en ovarios

El cuajado y desarrollo de los frutos es una fase muy importante en el desarrollo reproductivo de la planta. En tomate, es conocido que las GAs son necesarias para el cuajado y el correcto desarrollo de los frutos (Fos *et al*, 2000; Serrani *et al*, 2007a; García-Hurtado *et al*, 2012; Carrera *et al*, 2012). Los enzimas GA2ox controlan los niveles de GAs activas a través de la inactivación. Para estudiar si estos genes pueden estar regulando los niveles de GAs en el ovario comparamos su expresión en ovarios polinizados y no polinizados. A los 5 DPA, las diferencias de desarrollo entre los dos procesos son claramente apreciables (Figura RI.2A). De acuerdo al patrón de expresión observado los genes *SIGA2ox* pueden ser clasificados en dos grupos: los que muestran diferencias y los que no muestran diferencias entre ovarios polinizados y no polinizados. En el grupo de los que muestran diferencias entre los dos estadios están los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2* (Figura RI.2 B, C). Luego del día de antesis la expresión de estos genes aumenta en los ovarios emasculados y disminuye significativamente en los ovarios polinizados. El patrón de expresión de los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2*, en día cinco; muestra una relación inversa con el crecimiento del ovario, puesto que su expresión disminuye en tejidos que crecen activamente y aumenta en tejidos que no se desarrollan. Es conocido que, en ausencia de fertilización, el ovario no se desarrolla y los niveles de GAs descienden significativamente (Mariotti *et al*, 2011). Nuestros resultados sugieren que los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2* podrían actuar reduciendo los niveles de GAs en el ovario emasculado y de esta

forma evitar el crecimiento en ausencia de fertilización y por otro lado la fertilización podría activar el crecimiento del ovario, en parte por su acción represora sobre los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2*. En otras especies vegetales como *Arabidopsis thaliana* y guisante también se han observado diferencias en la expresión de los genes *GA2ox* entre ovarios polinizados y no polinizados. En *A.thaliana* la expresión de dos de los genes *GA2ox*: *GA2ox2* y *GA2ox6*, era significativamente mayor en ovarios no polinizados (Dorcey *et al*, 2009). En guisante, la expresión de los genes *GA2ox1* y *GA2ox2* también era significativamente mayor en los no polinizados, en los primeros días posteriores a la antesis (Ozga *et al*, 2009).

En el grupo de los genes cuya expresión no muestra diferencias entre ovarios polinizados y emasculados están los genes *SIGA2ox3*, *SIGA2ox4* y *SIGA2ox5* (Figura RI.2 D, E, F). Los genes *SIGA2ox3*, -4 y -5 también son muy abundantes en ovarios y en particular los genes *SIGA2ox4* y *SIGA2ox5* aumentan su expresión hasta casi 3 órdenes de magnitud después del día de antesis. Sin embargo, no observamos diferencias de expresión entre ovarios polinizados y emasculados por lo que basándonos solamente en su patrón de expresión, no podemos asignarles un posible papel en el crecimiento del ovario.

3. Regulación por retroalimentación de genes *SIGA2ox*

La expresión de los genes que codifican para los enzimas de tipo 2ODD, implicadas en la última parte de la ruta de biosíntesis de GAs puede ser regulada por las concentraciones endógenas de GAs activas. Esto tiene lugar por un mecanismo de retroalimentación negativa en los genes de biosíntesis *GA20ox* y *GA3ox*, y positiva en el caso de los genes *GA2ox* (Hedden y Thomas, 2012).

Nuestros resultados indican que los genes *SIGA2ox* no presentan este tipo de regulación en plántulas puesto que ninguno de los 5 genes *SIGA2ox* muestra el comportamiento esperado en respuesta a variaciones en las concentraciones de GAs (Figura RI.3 B, D, E). En otras especies vegetales también se han reportado genes *GA2ox* cuya expresión no parece regularse por mecanismos de retroalimentación como *Nerium oleander* (Úbeda-Thomas *et al*, 2006), arroz (Sakamoto *et al*, 2001) y calabaza (Lange *et al*, 2005). Curiosamente y contrario a lo esperado, observamos que la expresión del gen *SIGA2ox1* en los hipocotilos, se inducía significativamente al tratarse con PCB, sugiriendo que la expresión de este gen podría regularse de forma positiva por concentraciones bajas de GAs en este tejido. Esto también se ha observado en *A. thaliana*, dónde al tratarse plántulas con PCB, también se producía un incremento significativo en los niveles de transcritos de los genes *GA2ox2* y *GA2ox3* (Frigerio *et al*, 2006).

Resultados anteriores (García-Hurtado *et al*, 2012) habían mostrado que estos genes eran capaces de inducirse al subir las concentraciones de GAs cuando se hacían tratamientos muy largos y a concentraciones muy altas (concentraciones de GA_3 y PCB mayores de $10^{-2}M$ durante 46 días). Esta inducción también ocurría en tallos de plantas transgénicas con un mayor

contenido de GAs activas pero no en los frutos de estas plantas, donde al contrario estaban reprimidos (García-Hurtado *et al*, 2012). Todos estos resultados sugieren que la respuesta de los genes *SIGA2ox* ante cambios en las concentraciones de GAs depende del tejido, el estadio y las condiciones del tratamiento empleado. Además, sugieren que en plántulas estos genes no intervienen en la homeostasis de GAs, contrario a lo observado en *Nicotiana tabacum*, otra especie solanácea (Gallego-Giraldo *et al*, 2008).

Como control, en este trabajo analizamos la expresión del gen de biosíntesis *SIGA2ox1*, el cual había sido caracterizado con anterioridad y cuya expresión en plántulas se regulaba negativamente ante un incremento en los niveles de GAs (Martí *et al*, 2010). Nuestros resultados confirman que la expresión de este gen se regula por mecanismos de retroalimentación negativa, pero esta regulación no sucede en hipocotilos sino en la porción apical de las plántulas (Figura RI.3 B, D, E).

CONCLUSIONES I

1. Los genes *SIGA2ox* se expresan de forma redundante a lo largo del desarrollo vegetativo y reproductivo de tomate aunque su grado de expresión varía de acuerdo al tejido y al estadio.
2. El patrón de expresión de los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2* en ovarios sugiere que podrían tener un papel como reguladores negativos del crecimiento del ovario probablemente reduciendo los niveles de GAs activas en ovarios no fertilizados.
3. Los genes *SIGA2ox* más representados en tejidos vegetativos de la planta son *SIGA2ox3*, *SIGA2ox4* y *SIGA2ox5*, lo cual sugiere que podrían actuar regulando los niveles de GAs en estos tejidos.
4. Los genes *SIGA2ox* no parecen tener un papel en la homeostasis de GAs en plántulas ya que su expresión no se induce por incrementos en los niveles de GAs activas.
5. La regulación por retroalimentación del gen de biosíntesis *SIGA2ox1* en plántulas depende del tejido ya que se regula negativamente por giberelinas en la porción apical de las plántulas y no en los hipocotilos.

***CAPÍTULO II: SILENCIAMIENTO MÚLTIPLE DE GENES
SIGA2_{ox} EN PLANTAS DE TOMATE***

RESULTADOS II

1. Obtención del transgén *35S::shRNA2ox*

Para realizar silenciamiento génico post-transcripcional de todos los genes *SIGA2ox* escogimos una construcción tipo horquilla (shRNA). En este tipo de construcciones se clonan secuencias homólogas al gen o genes que se quiera silenciar en orientaciones invertidas separadas por un intrón. Estas secuencias al transcribirse, por autocomplementariedad, forman una estructura en forma de horquilla que es reconocida por la maquinaria celular y entra a la ruta de silenciamiento produciendo posteriormente la degradación de los mensajeros del gen correspondiente (Smith *et al*, 2000).

La longitud recomendada para lograr una alta eficiencia de silenciamiento usando una construcción tipo shRNA es de 300-600pb (Helliwell y Waterhouse, 2003). Al alinear las secuencias de los 5 genes de *GA2ox* no se encontró una secuencia consenso de la longitud recomendada. De acuerdo a la similitud de secuencias los 5 genes *SIGA2ox* se pueden agrupar en tres grupos independientes. En un grupo quedan los genes *SIGA2ox2*, 4 y 5 y en dos grupos independientes quedan los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox3*. Basados en esto se decidió construir un fragmento quimérico, formado por un fragmento representativo de cada grupo. Se escogió un fragmento de 163pb de la *SIGAox4* que tiene un 95% de similitud de secuencia con la *SIGA2ox2* y un 92% con la *SIGA2ox5*, otro de 188pb de la *SIGA2ox1* y otro fragmento de 123pb de la *SIGA2ox3* (Materiales y Métodos, Apartado 2.2).

Como se explica en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos se diseñó un fragmento híbrido de 506pb que pudiera ser empleado en la inducción del silenciamiento múltiple de los genes *SIGA2ox*. Este fragmento se forma al unir secuencias de los genes *SIGA2ox1*, 3 y 4, amplificadas de forma individual por PCR que luego se usaron como molde en una segunda reacción de PCR solapante donde se unieron y quedó conformado el fragmento híbrido de 506pb (Figura M.1). Este fragmento se purificó (Figura RII.1) y se clonó en el vector pGEM-T Easy. Se seleccionaron los clones positivos mediante PCR, se purificó el DNA plasmídico y se envió a secuenciar. Al hacer el análisis de las secuencias se pudo constatar que los fragmentos habían quedado unidos correctamente y que no existían errores en las secuencias. A continuación, se le incorporaron los sitios attB1 y attB2, mediante una reacción de PCR, para que de esta forma se pudiera clonar en el vector pDNOR 221, usando el sistema de clonaje Gateway de Invitrogen, tal como se describe en el apartado 3.3 del capítulo de Materiales y Métodos (Figura M.3).

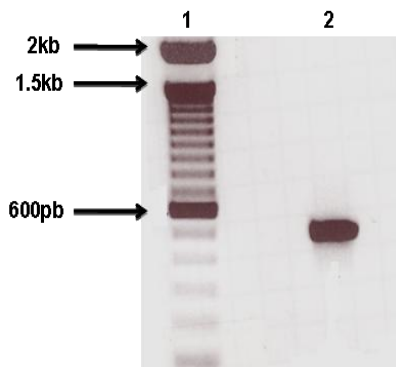


Figura RII.1. Fragmento shRNA2ox resultado de la reacción de PCR solapante. En esta figura se muestra el fragmento de PCR luego de ser purificado usando el kit de Invitrogen PureLink™ Quick Gel Extraction Kit. Carril 1: Patrón de Masas Moleculares GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas); Carril 2: Fragmento shRNA2ox purificado.

Una vez que se le hubieran incorporado los sitios attB en los extremos se clonó por recombinación BP en el vector pDNOR 221. Los clones positivos se seleccionaron de la misma forma que en el paso anterior de clonaje. Finalmente el fragmento se clonó en el vector pK7GWIWG2 (II) por recombinación LR. Este paso de clonaje no fue posible verificarlo por PCR puesto que esta construcción forma una estructura en forma de horquilla muy compleja de amplificar, por lo que se verificó por digestión enzimática con el enzima de restricción KpnI (Figura RII.2).

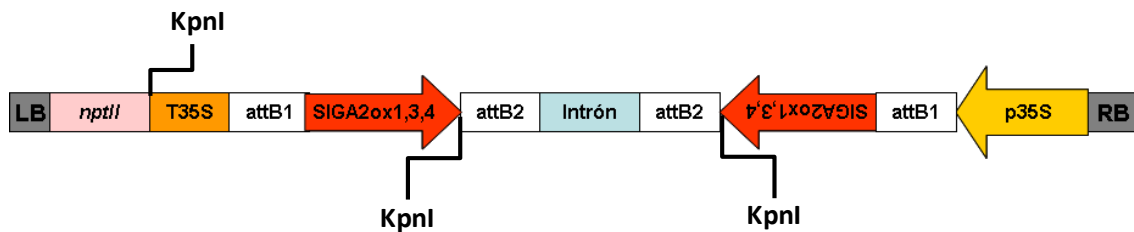


Figura RII.2. Representación esquemática de la ubicación de los sitios del enzima de restricción KpnI en la construcción 35S::shRNA2ox.

En el vector pK7GWIWG2 (II) existe un solo sitio KpnI, al insertarse los dos fragmentos *SIGA2ox1,3,4* se añaden otros dos sitios KpnI adicionales. Al digerir con este enzima si no se han insertado las secuencias se debe ver solamente el plásmido linealizado. Si se han insertado correctamente ambas secuencias se debe observar el plásmido linealizado, una banda de 1.5kb aproximadamente que corresponde al intrón que queda entre las dos secuencias *SIGA2ox1,3,4* y otra banda más pequeña de unos 760pb. En la figura RII.3 se puede apreciar que al digerirse los clones 1 y 2 se liberan bandas de la talla esperada.

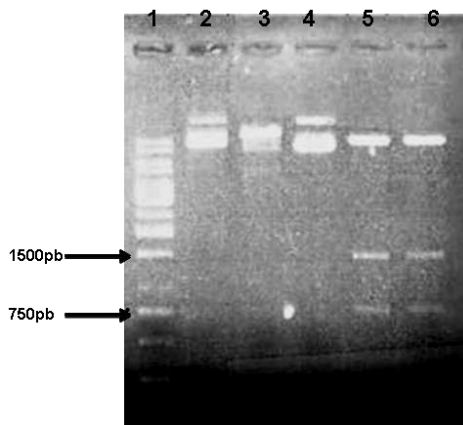


Figura RII.3. Digestión chequeo KpnI clones 1 y 2. Carril 1: Patrón de Masas Moleculares GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); Carril 2: vector pK7GWIWG2 (II) nativo; Carril 3: vector pK7GWIWG2 (II) digerido con la enzima KpnI; Carril 4: Clon 1 nativo; Carriles 5 y 6: Clones 1 y 2 digeridos con la enzima KpnI.

Con esta construcción final se transformó *A.tumefaciens* LBA 4404. El clonaje en *A.tumefaciens* se verificó igualmente por digestión enzimática, aunque con la particularidad de que el DNA plasmídico obtenido de *A.tumefaciens* no tenía la calidad para este tipo de análisis y se re-transformó *E. coli* para poder llevar a cabo la digestión de comprobación, donde se obtuvo igual resultado al que se muestra en la figura RII.3. Una vez que se tuvo un clon de *A.tumefaciens* que portara la construcción *35S::shRNA2ox* se procedió a transformar explantes de tomate.

2. Obtención de plantas transgénicas de tomate *35S::shRNA2ox*

Con objeto de estudiar el efecto del silenciamiento múltiple de genes de *SIGA2ox* en tomate transformamos genéticamente plantas de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom con la construcción *35S::shRNA2ox*. Los experimentos de transformación genética se llevaron a cabo mediante cocultivo de explantes de hojas con la cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* y el método de transformación descrito por Ellul *et al*, 2003. En la transformación se utilizaron, como testigos internos, explantes regenerados mediante cultivo *in vitro* no inoculados con *A. tumefaciens*. A las 3 semanas de inoculación empezaron a formarse callos resistentes a la kanamicina en la zona de corte del explante, en el 30% de los explantes. Cinco semanas después de la inoculación, en un 60-70% de los explantes se distinguían zonas verdes y compactas con estructuras organogénicas (yemas-ápice). A las 7-8 semanas de cultivo, los callos organogénicos mostraron, en su mayoría, brotes adventicios. En este estadio se eliminaron las zonas necróticas y se subcultivaron los callos cada 3-4 semanas. A las 9-10 semanas de cultivo casi la totalidad de los callos organogénicos presentaron brotes individuales, aunque la mayor parte de los ápices se aislaron entre el tercer y cuarto subcultivo (12-16 semanas de cultivo). Los brotes individualizados en los distintos experimentos de transformación genética se cultivaron en medio de enraizamiento con el antibiótico kanamicina (100 mg/L) para permitir la adecuada elongación del tallo y la aparición de un número de yemas axilares suficiente para su propagación clonal. Al individualizar los brotes y ponerlos en medio de enraizamiento se cortaron las hojas de los mismos y se usaron para medir el nivel de ploidía. En este experimento de transformación se obtuvo un 12% de transformantes tetraploides, lo cuales fueron desechados. En los experimentos posteriores se continuó solamente con los diploides.

2.1 Eficacia de transformación

La tasa útil de transformación fue del 7%. Esto indica que, se han obtenido 7 plantas transgénicas diploides independientes (procedentes de eventos independientes de transformación) por cada 100 explantes inoculados, tal como se muestra en la tabla RII.1

Tabla RII.1. Tasa efectiva de transformación y total de plantas independientes obtenidas *in vitro*.

N° EXPLANTES INOCULADOS	TOTAL PLANTAS INDEPENDIENTES DIPLOIDES	TASA EFECTIVA TRANSFORMACIÓN (%)
260	19	7.31

Con estas 19 plantas se obtuvieron copias clonales de las mismas pero en este paso se perdieron otras 13 plantas puesto que al cortarse los tallos y raíces y pasarse a un medio nuevo perdieron vigor y murieron. Al final del experimento sólo se pudieron llevar a condiciones de invernadero 6 plantas independientes.

2.2 Segregación del gen *nptII* en la primera generación de plantas transgénicas (TG1)

De las 6 líneas TG1 llevadas a condiciones de invernadero se obtuvieron las semillas y se determinó la segregación del transgén analizando la proporción de plantas resistentes y sensibles a la kanamicina (gen *nptII*). Este análisis mostró que solamente 4 líneas cumplían la proporción 3:1 de Resistentes:Sensibles (correspondiente a la inserción en un locus): L1, L5, L22 y L81. Otra de ellas cumplía una proporción de 15:1 (correspondiente a inserciones en dos loci): L13 y la última no se ajustaba a las segregaciones esperadas para uno o dos loci: L25 (Tabla RII.2). Se utilizaron las líneas que cumplían con la proporción 3:1 para seleccionar plantas homocigotas. Para los experimentos posteriores de caracterización fisiológica, se usaron principalmente las líneas L1 y L5.

Tabla RII.2. Segregación gen *nptII* en TG1.

LÍNEA	RESISTENTES	SENSIBLES	TOTAL	PROPORCIÓN	X² CALCULADO	P
1	25	6	31	3:1	0,527	0,45
5	31	6	37	3:1	1,523	0,2
13	52	1	53	15:1	1,722	0,15
22	40	12	52	3:1	0,103	0,7
25	23	26	49	1:1	0,184	0,7
81	39	14	53	3:1	0,0566	0,8

3. Evaluación de silenciamiento de genes *SIGA2ox* en plantas transgénicas *35S::shRNA2ox*

La introducción del transgén *35S::shRNA2ox* en plantas de tomate tiene como objetivo reducir y/o eliminar la expresión de los genes *SIGA2ox* en la planta, induciendo el silenciamiento génico. Para evaluar la eficacia de la construcción *35S::shRNA2ox* analizamos la expresión de los genes *SIGA2ox* en diferentes tejidos de la planta, mediante RT-qPCR.

3.1 Silenciamiento de los genes *SlGA2ox* en tejidos vegetativos

El silenciamiento en tejidos vegetativos fue reducido y variable. Los genes *SlGA2ox1* y *SlGA2ox2* no se silenciaron en ningún tejido (Figura RII.4).

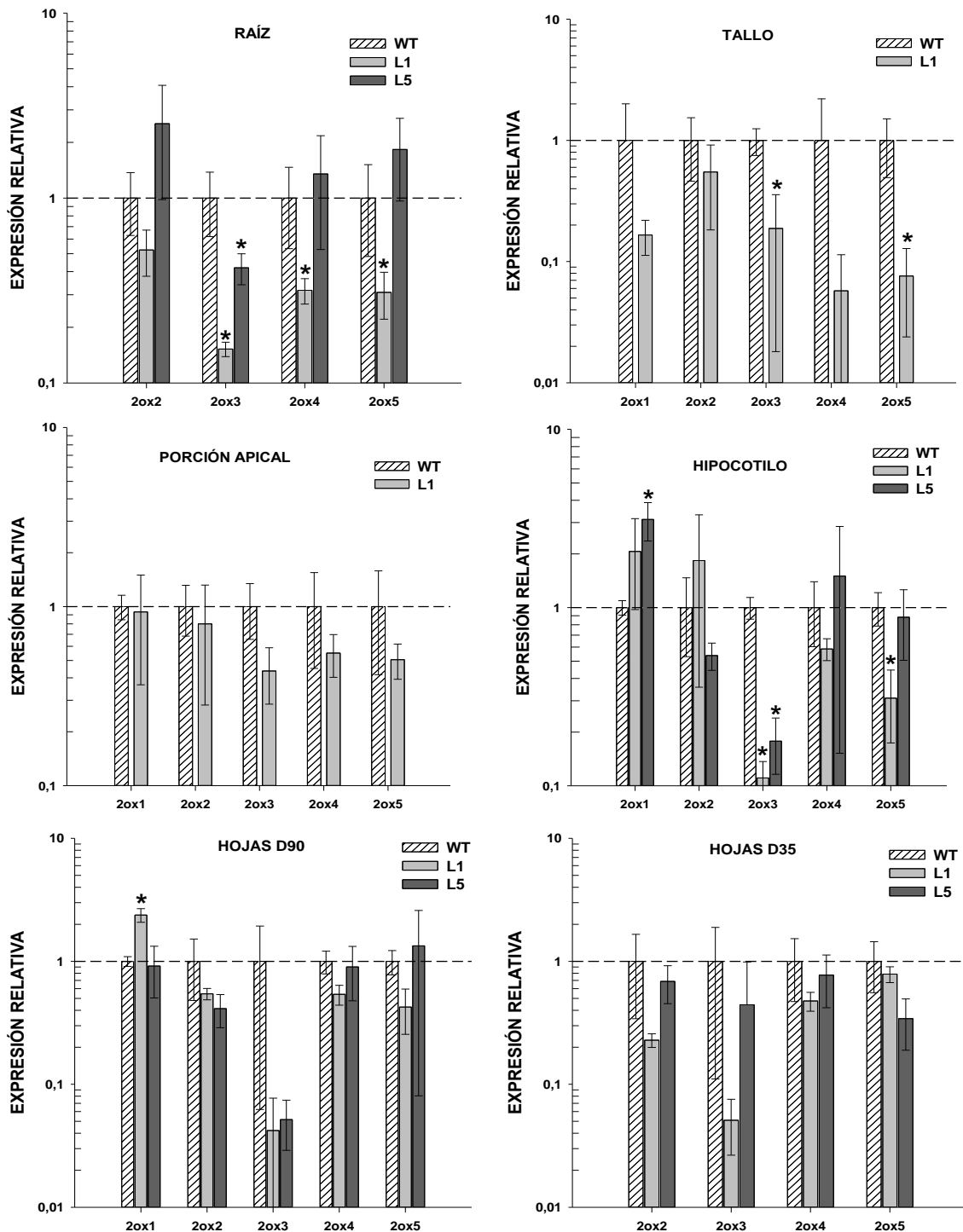


Figura RII.4. Expresión relativa de los genes *SlGA2ox* en tejidos vegetativos de las plantas transgénicas Raíz de plantas adultas (90 días); Tallo de plantas adultas jóvenes (antes de la antesis); Porción apical de plantas adultas jóvenes (antes de la antesis); Hipocotilos de plántulas de 7 días; Hojas D90: Hojas de plantas adultas de 90 días de edad; Hojas D35 Hojas de plantas adultas jóvenes de 35 días de edad (plantas jóvenes en floración). Los valores de expresión son relativos al valor de expresión en las plantas silvestres (1.0) y son el resultado de la media de tres réplicas biológicas \pm STD
*, significativamente diferente del silvestre ($P < 0.05$)

El gen *SIGA2ox4* solamente se silenció en raíz. Los genes más silenciados fueron los genes *SIGA2ox3* y *SIGA2ox5* que se silenciaron en tres tejidos: raíz, tallo e hipocotilo. En algunos tejidos, como por ejemplo en hojas no se silenció ningún gen *SIGA2ox*. La expresión del gen *SIGA2ox1* no pudo analizarse en raíz puesto que el nivel de expresión de este gen en ese tejido es muy bajo, casi indetectable y en algunas de las réplicas biológicas de las plantas transgénicas no se produjo amplificación. La tabla RII.3 muestra los porcentajes de reducción de la expresión de los genes *SIGA2ox* y los valores de expresión relativa aparecen resumidos en el apartado de Anexos en la Tabla S1. En todos los casos donde se detectó silenciamiento este fue mayor del 50% (Tabla RII.3).

Tabla RII.3. Resumen del análisis del silenciamiento de los genes *SIGA2ox* en tejidos vegetativos en las líneas L1 y L5. Los porcentajes expresados se refieren al porcentaje de silenciamiento del gen en cada tejido respecto al silvestre. Las casillas en blanco indican que en ese estadio no se analizó ese gen.

NS: No silenciado

TEJIDOS	L1					L5				
	GENES					GENES				
	2ox1	2ox2	2ox3	2ox4	2ox5	2ox1	2ox2	2ox3	2ox4	2ox5
Raíz	-	NS	84,7%	68,3%	69,1%	-	NS	58%	NS	NS
Tallo	NS	NS	81,3%	NS	92,4%	-	-	-	-	-
Porción apical	NS	NS	NS	NS	NS	-	-	-	-	-
Hipocotilo	NS	NS	89%	NS	69%	NS	NS	82,2%	NS	NS
Hoja d90	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hoja d35	-	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS	NS	NS

3.2 Silenciamiento de genes *SIGA2ox* en tejidos reproductivos

Como tejidos reproductivos usamos ovarios en diferentes estadios. En estos tejidos el silenciamiento detectado fue mayor que en los tejidos vegetativos puesto que todos los genes se silenciaron en al menos un estadio (Figura RII.5). El gen más silenciado fue el *SIGA2ox4* ya que en dos de las líneas transgénicas se silenció eficientemente en todos los estadios analizados. El gen menos silenciado fue el gen *SIGA2ox5*. Los tejidos con mayor silenciamiento fueron los ovarios polinizados de 10 días y los ovarios emasculados de 5 días. El estadio con menos silenciamiento fue el de ovarios en antesis. Al igual que en los tejidos vegetativos, en todos los casos que se detectó reducción de los transcritos de los genes *SIGA2ox* esta fue mayor o igual del 50% y en muchos casos mayor del 90% (Tabla RII.4). Los valores de expresión relativa aparecen resumidos en el apartado de Anexos en la Tabla S2.

Tabla RII.4. Resumen del análisis del silenciamiento de los genes *SIGA2ox* en tejidos vegetativos en las líneas L1, L5 y L81. Los porcentajes expresados se refieren al porcentaje de silenciamiento del gen en ese tejido respecto al silvestre. NS: No silenciado.

	L1				L5				L81		
	d0	p+5	p+10	e+5	d0	p+5	p+10	e+5	d0	p+5	e+5
2ox1	NS	NS	72.6%	83.4%	NS	NS	83.9%	63.6%	NS	NS	49.8%
2ox2	NS	NS	NS	91%	NS	NS	72.6%	90.4%	NS	NS	66.1%
2ox3	NS	90.3%	94.5%	87.5%	NS	89.8%	82%	NS	NS	NS	84%
2ox4	86.4%	60.5%	94.5%	68.6%	77.2%	57.2%	98%	78.7%	NS	71.7%	NS
2ox5	NS	NS	88.6%	NS	NS	NS	95.8%	64.9%	NS	NS	NS

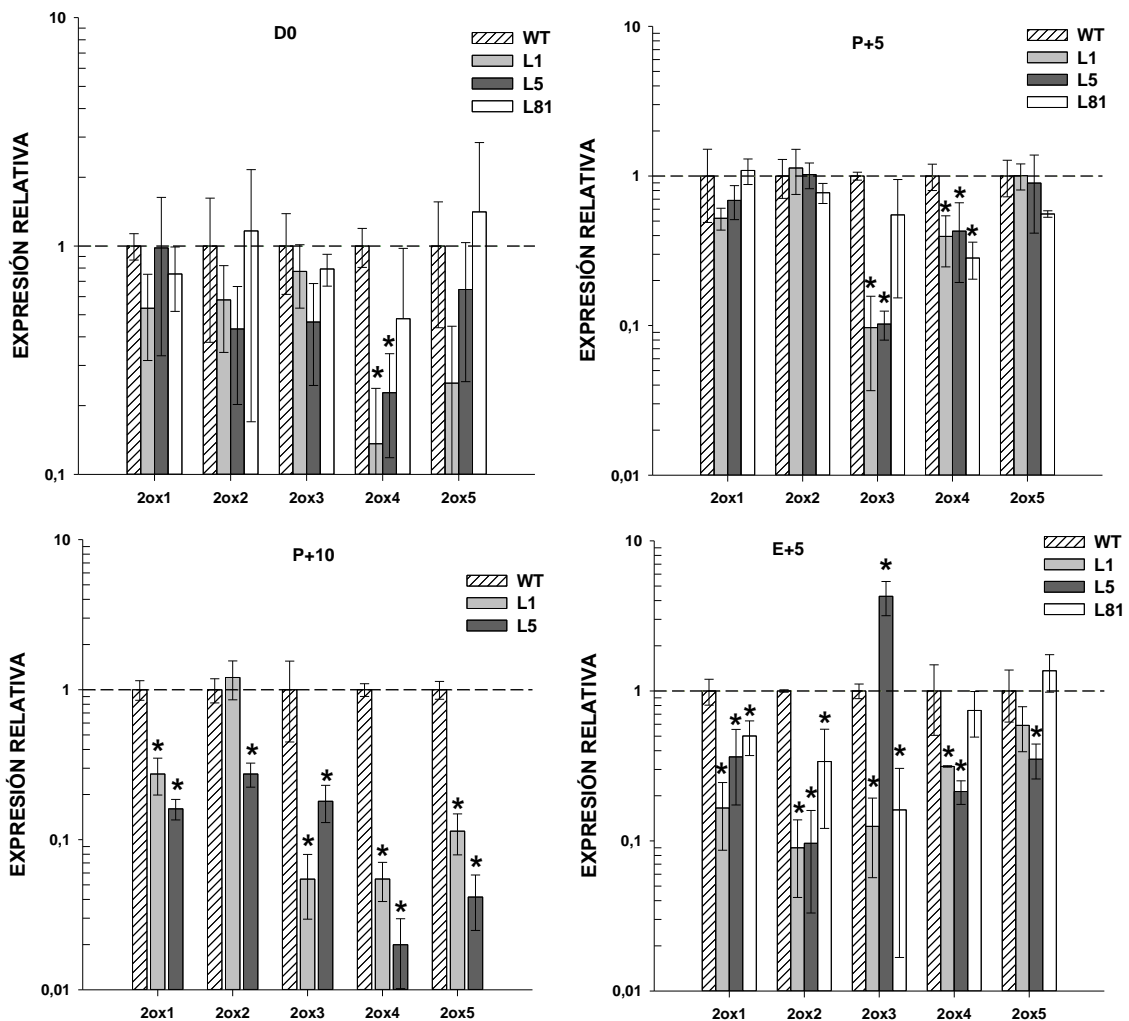


Figura RII.5. Expresión relativa de los genes *SIGA2ox* en tejidos reproductivos de las plantas transgénicas D0: Ovarios de flores en antesis; P+5: Ovarios polinizados de 5 días; P+10: Ovarios polinizados de 10 días; E+5: Ovarios emasculados de 5 días. Los valores de expresión son relativos al valor de expresión en las plantas silvestres (1.0) y son el resultado de la media de tres réplicas biológicas \pm STD.

*, significativamente diferente del silvestre ($P < 0.05$)

3.3 Expresión de genes de biosíntesis en ovarios polinizados

Para estudiar el efecto del silenciamiento de los genes *SIGA2ox* sobre otros genes de la ruta de biosíntesis se determinó la expresión de genes de biosíntesis *SIGA20ox* y *SIGA3ox* en ovarios polinizados de 10 días. En esta muestra se habían silenciado eficientemente todos los genes *SIGA2ox* y se observaba un incremento significativo en los niveles de la GA activa GA₄ (Figura RII.5; Tabla RII.16).

En la línea transgénica L1 se detectó un aumento significativo en la expresión del gen de biosíntesis *SIGA20ox1* y una disminución en la expresión del gen *SIGA20ox3* (Figura RII.6). En cambio no se detectaron cambios significativos en la expresión del gen *SIGA20ox2* ni de los genes *SIGA3ox*. En la línea transgénica L5 se observó disminución en los niveles de mRNA de los genes *SIGA3ox* y *SIGA20ox3* y no se observaron cambios en la expresión de los genes *SIGA20ox1* y *SIGA20ox2*.

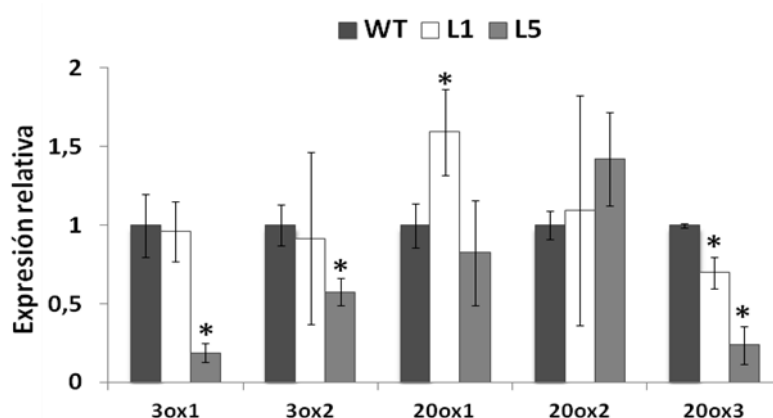


Figura RII.6. Expresión relativa de genes de biosíntesis *SIGA20ox* y *SIGA3ox* en ovarios polinizados de 10 días. Los resultados son la media de tres réplicas biológicas \pm STD.

*, significativamente diferente del silvestre ($P < 0.05$).

4. Evaluación de características fenotípicas en plantas transgénicas

35S::shRNA2ox

El efecto esperado del silenciamiento de los genes *SIGA2ox* es un aumento en los niveles de GAs de la planta. Dado que las GAs actúan como reguladores de varios procesos del desarrollo de la planta evaluamos varios caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo en las plantas transgénicas obtenidas.

4.1 Desarrollo vegetativo

4.1.1 Germinación

La germinación de las semillas es un proceso regulado de forma positiva por las GAs. Es conocido que mutantes deficientes de síntesis de GAs como el *gib-1* presenta un retraso

considerable en la germinación (Groot y Karssen, 1987; Koornneef, 1990) y que el mutante *procera* de respuesta constitutiva a GAs presenta un adelanto en la germinación de las semillas (Bassel *et al*, 2008). Analizamos la germinación de las líneas transgénicas L1, L5 y el silvestre usando tres lotes diferentes de semillas para eliminar posibles discrepancias debidas a la edad, tiempo de almacenamiento u otras desigualdades entre lotes y no observamos diferencias atribuibles a la presencia del transgén (Figura RII.7).

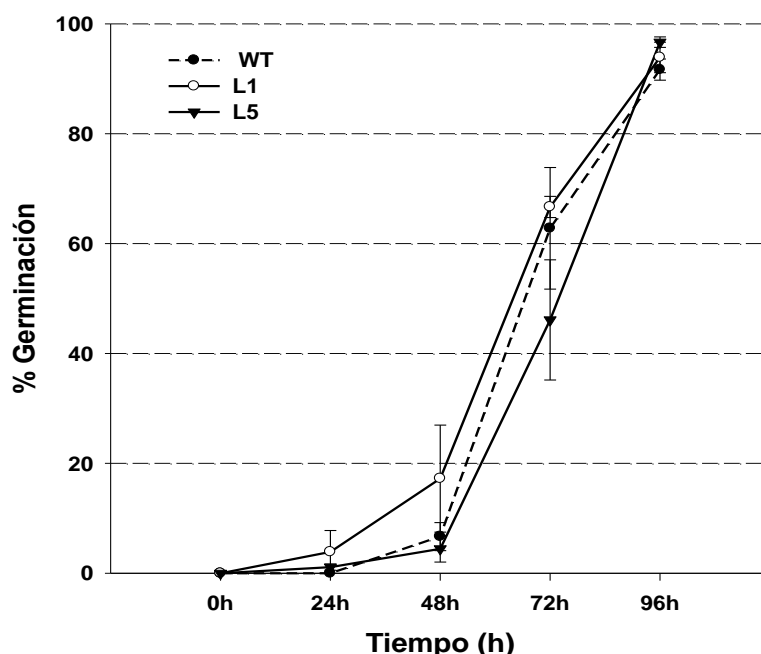


Figura RII.7. Germinación de semillas de líneas transgénicas L1, L5 y silvestre. Los datos aparecen como el porcentaje de semillas germinadas en el tiempo. Estos datos corresponden a la media de tres lotes diferentes de semillas en cada línea (Media \pm SE).

4.1.2 Longitud de hipocotilo y raíz en plántulas

Al igual que sucede con la germinación, las GAs regulan positivamente la longitud del hipocotilo y de las raíces en las plántulas (Collett *et al*, 2000; García-Hurtado *et al*, 2012). Sin embargo, como se observa en la Tabla RII.5, las líneas transgénicas no mostraron incrementos significativos en la longitud de hipocotilos y raíces. En el caso de la línea L5 los hipocotilos resultaron significativamente más cortos que los del silvestre.

Tabla RII.5. Longitud hipocotilos y raíces de plántulas de 7 días. Los resultados aparecen representados como Media \pm SE. WT (N=16); L1 (N=12); L5 (N= 13)

*, significativamente diferente del silvestre (P<0.05)

Línea	Longitud de hipocotilo (cm)	Longitud de raíz (cm)
WT	1,57 \pm 0,04	5,90 \pm 0,61
L1	1,62 \pm 0,07	6,14 \pm 0,61
L5	1,36 \pm 0,04*	4,88 \pm 0,42

4.1.3 Morfología de plantas adultas

Las GAs promueven la elongación de los entrenudos del tallo. Un efecto fenotípico muy característico de que existe una mayor cantidad de GAs activas en la planta es un alargamiento de los entrenudos del tallo, resultando en plantas más altas con tallos más finos. Además el tamaño de las hojas también puede verse afectado por las concentraciones de GAs.

No observamos diferencias entre las plantas transgénicas y las plantas silvestres en el desarrollo del tallo, tanto en la altura total hasta la primera inflorescencia como en la longitud del entrenudo, medida entre la cuarta y la quinta hoja (Tabla RII.6). El desarrollo de las hojas y las raíces tampoco presentaba diferencias detectables.

Tabla RII.6. Características fenotípicas del desarrollo vegetativo de las líneas transgénicas L1 y L5 y el silvestre. Los datos aparecen representados como Media \pm SE de un mínimo de 10 plantas. El diámetro del tallo y la longitud del entrenudo se midieron en el quinto entrenudo. El área de hoja y el número de folíolos corresponden a la quinta hoja.

Fenotipos vegetativos			
Parámetro	WT	L1	L5
Altura hasta la primera inflorescencia (cm)	11,86 \pm 0,47	12,70 \pm 0,59	10,95 \pm 0,61
Número de hojas hasta la primera inflorescencia	7,82 \pm 0,42	7,70 \pm 0,35	7,18 \pm 0,30
Diámetro del tallo (cm)	0,65 \pm 0,03	0,62 \pm 0,01	0,65 \pm 0,02
Longitud de entrenudo (cm)	1,88 \pm 0,11	1,92 \pm 0,13	1,86 \pm 0,10
Área de hoja (cm ²)	179,1 \pm 15,4	210,2 \pm 10,4	183,8 \pm 8,5
Número de folíolos	5,70 \pm 0,40	6,10 \pm 0,33	5,64 \pm 0,39
Peso fresco de raíz (g)	6,52 \pm 0,38	7,03 \pm 0,85	7,16 \pm 0,57

4.1.4 Arquitectura de la planta

El cultivar Micro-Tom presenta un patrón de crecimiento determinado. Tras la producción de 6-9 hojas el ápice vegetativo primario termina con dos inflorescencias y en la axila inferior más próxima se desarrolla un brote axilar con 4 hojas y 2 inflorescencias (Figura I.8B). Luego de la antesis de las primeras flores, comenzando por las axilas más próximas al brote apical, comienzan a desarrollarse ramas laterales. Al final del desarrollo (aproximadamente 90 días) la planta adquiere un aspecto compacto similar a un arbusto (Figura I.12). El hábito de crecimiento de nuestras líneas transgénicas continuó siendo determinado, pero en cambio se observaron diferencias en el patrón de ramificación. Como se ve en la Figura RII.8, las plantas transgénicas presentaban menos ramificaciones que el silvestre.

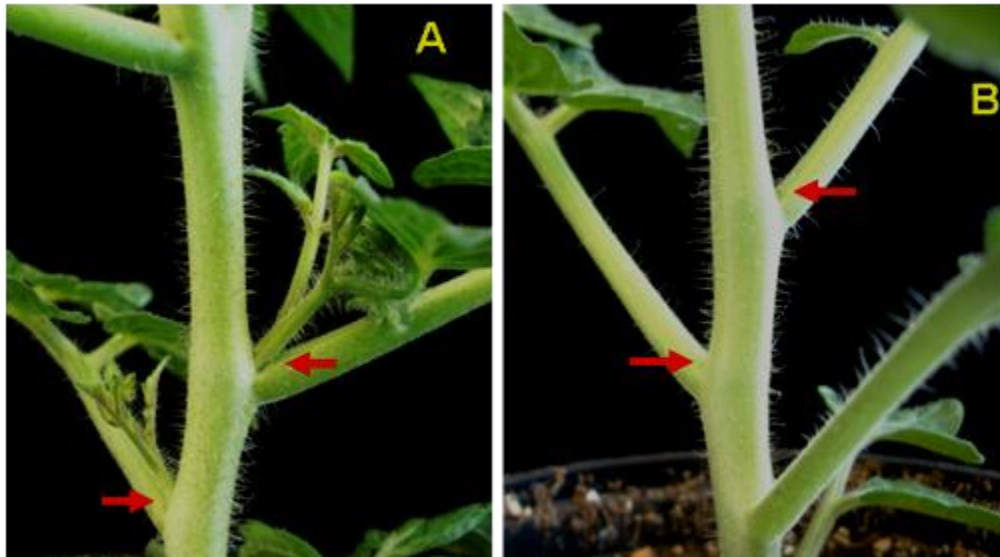


Figura RII.8. Aparición de brotes laterales en plantas silvestres (A) y línea transgénica L1 (B). Esta imagen corresponde a plantas adultas de 42 días de edad.

Para analizar cuantitativamente este efecto fenotípico seguimos, durante 80 días, el desarrollo de los brotes laterales que aparecían en todas las axilas bajo el brote simpodial (Figura I.8B) en las plantas silvestres y transgénicas. Tomamos como dato de comparación el porcentaje (%) de axilas con ramas respecto al número total de axilas de la planta. A efectos de esta comparación consideramos como ramificadas aquellas axilas en las cuales hubiese crecido un brote mayor o igual a 0,5 cm. Para este análisis también usamos la línea transgénica L19 que sobreexpresa el gen de biosíntesis *CcGA20ox1* y el mutante *procera*, que es un mutante de pérdida de función de la proteína DELLA y que tiene activada constitutivamente la respuesta a GAs (Tabla RII.7). Ambas líneas presentan las características típicas de sobreproducción de giberelinas (Figura RII.9).

Tabla RII.7. Características genotípicas de líneas empleadas en el análisis del patrón de ramificación y número de plantas por línea empleadas en el experimento.

Línea	N	Genotipo
L1	10	Líneas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i> . Silenciamiento genes de enzimas catabólicos GA2ox
L5	10	
L19	10	Línea transgénica <i>35S::CcGA20ox1</i> . Sobre-expresión de gen de enzima de biosíntesis GA20ox1 (García-Hurtado <i>et al</i> , 2012)
procera	10	Mutante <i>SIDELLA</i> . Pérdida de función de proteína DELLA. Activación constitutiva de vía de respuesta a GAs (Bassel <i>et al</i> , 2008; Carrera <i>et al</i> , 2012)
MT	22	Cultivar Micro-Tom. Crecimiento determinado, deficiencia brasinosteroides (mutación alelo <i>d</i>) (Martí <i>et al</i> , 2006)

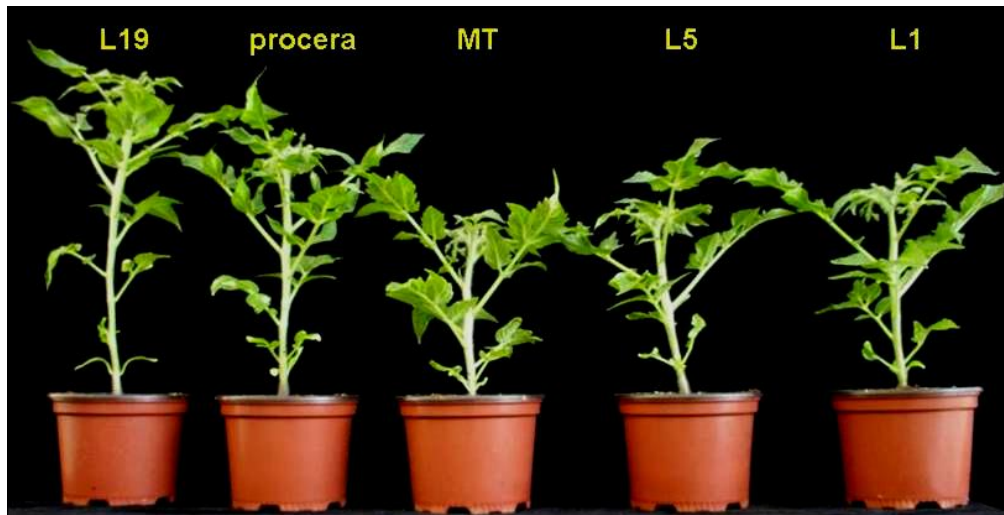


Figura RII.9. Líneas empleadas para el análisis de la aparición de ramas laterales. Esta imagen corresponde a plantas adultas en floración antes de la aparición de brotes laterales.

Las líneas transgénicas *35S::shRNA2ox* mostraron inhibición del desarrollo de los brotes laterales, al igual que las líneas L19 y *procera* (Figura RII.10). Esta inhibición se traduce en un retraso en la aparición de ramas laterales y un número menor de ramas. En el día 40, las plantas silvestres ya habían sobrepasado el 60% de axilas ramificadas mientras que las otras plantas no habían alcanzado el 30%. Durante el tiempo que duró el experimento fueron apareciendo ramas laterales en todas las plantas aunque tanto en las plantas transgénicas como en el mutante *procera* apareció un número significativamente menor de ramas. Al final del experimento, solamente la línea L19 alcanzó el 50% de axilas ramificadas mientras que las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* y *procera* no lo alcanzaron. Las plantas silvestres no llegaron a alcanzar el 100% de plantas con axilas ramificadas, debido a que en las axilas inferiores 1 y 2 no aparecieron brotes.

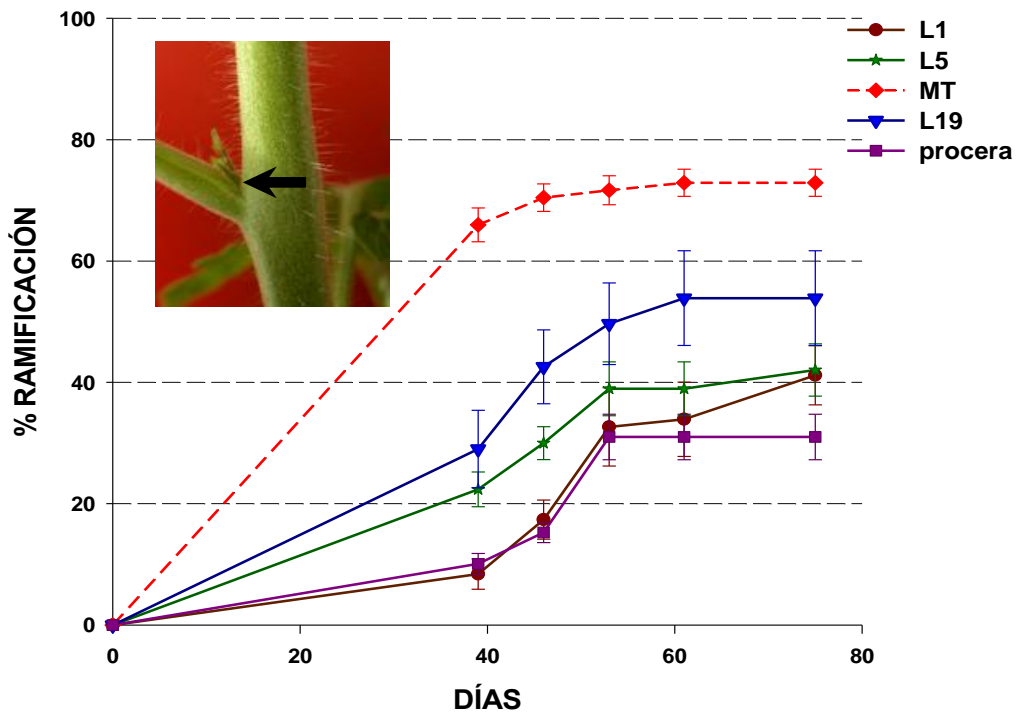


Figura RII.10. Evolución temporal de la aparición de ramas en las líneas transgénicas L1, L5 y L19 y mutante *procera* comparado con las plantas silvestres (cv Micro-Tom). Los datos aparecen representados como Media \pm SE del porcentaje de axilas con ramas \geq 0.5cm (ver esquina superior izquierda donde se muestra un brote lateral de 0.5cm) respecto al número total de axilas de la planta a lo largo de 80 días.

Para comprobar si la inhibición de la ramificación en las líneas transgénicas se debía a un incremento en los niveles de GAs activas, tratamos plantas con el inhibidor de biosíntesis Paclobutrazol (PCB). Aplicamos el inhibidor a plantas adultas de 27 días de edad, en las cuales aún no habían aparecido brotes laterales. Tratamos durante 15 días, plantas de la línea L1 y el silvestre con una concentración de PCB de 10^{-5} M o 10^{-6} M. Al cabo de este tiempo todas las plantas tratadas se habían enanizado (Figura RII.11). Las plantas transgénicas resultaron igualmente sensibles al efecto del PCB mostrando ambas líneas una reducción de la altura entre el 30 y el 40% (Figura RII.12A).

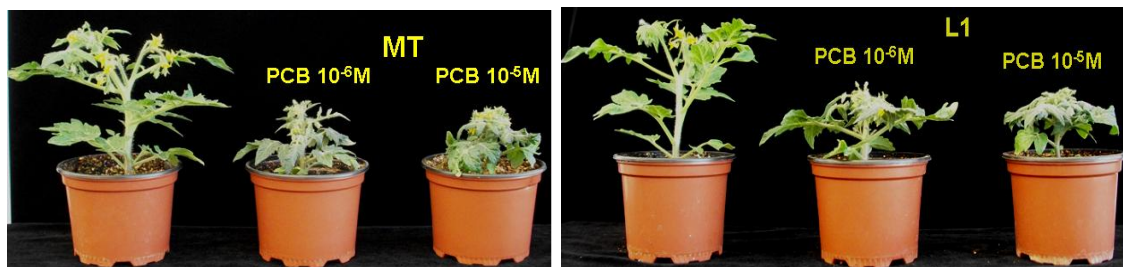


Figura RII.11. Influencia del tratamiento con PCB (10^{-5} M y 10^{-6} M) sobre el crecimiento de plantas de la línea transgénica 1 y el silvestre.

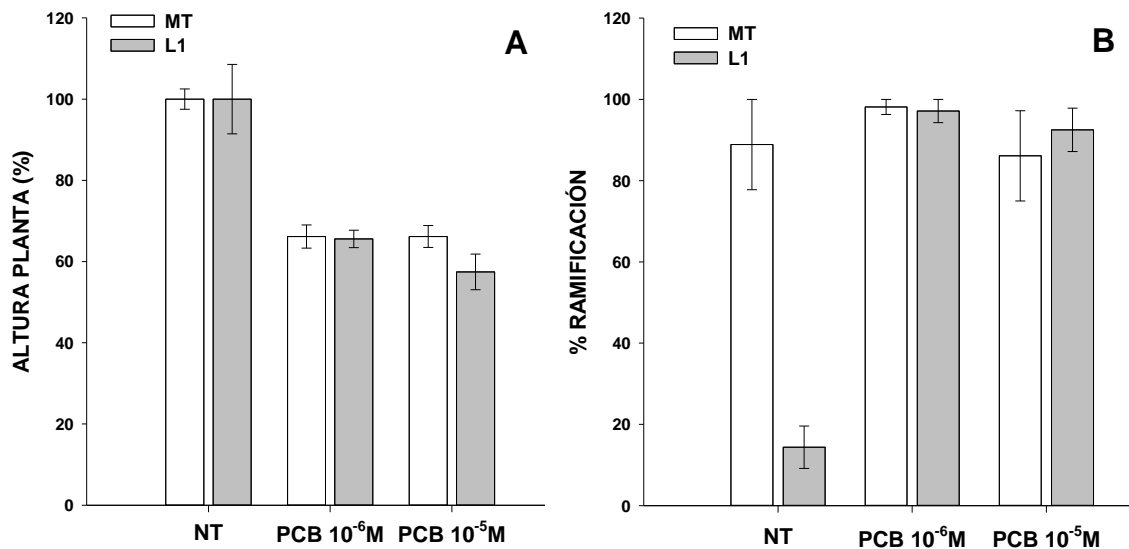


Figura RII.12. Efecto de la aplicación de dos dosis de PCB (10^{-5}M y 10^{-6}M) a plantas silvestres (MT) y línea transgénica L1. A: Altura de las plantas expresadas como porcentaje (%) de la altura de las plantas no tratadas (NT). B: Efecto del tratamiento con PCB sobre la aparición de ramas laterales. Los datos de ramificación aparecen representados como Media \pm SE del porcentaje de axilas con ramas ≥ 0.5 cm.

En cuanto al fenotipo de ramificación (Figura RII.12B) el tratamiento con el inhibidor no produjo cambios en la aparición de ramas laterales en las plantas silvestres pero sí en las plantas de la línea transgénica L1. Al tratar las plantas de la línea L1 con PCB se inducía la aparición de ramas laterales, revirtiendo su fenotipo a un fenotipo silvestre (Figura RII.12B). Este resultado, sugiere que el efecto de inhibición de la ramificación lateral está mediado por GAs.

4.1.4.1 Influencia de los brasinosteroides en el patrón de ramificación de las plantas transgénicas

Los brasinosteroides (BR), al igual que las GAs, son hormonas vegetales de tipo esteroides (Bishop y Yokota, 2001). El cultivar de tomate Micro-Tom es deficiente en la síntesis de BRs debido a una mutación en el gen *DWARF* (*D*) que codifica para un enzima de la ruta de biosíntesis de esta hormona (Martí *et al*, 2006). Es conocido que los BR modifican la respuesta de la planta a GAs y que la ausencia de BR hace a Micro-Tom menos sensible al efecto de las GAs (Martí *et al*, 2006). El efecto inhibitorio de las GAs sobre la ramificación ha sido detectado en líneas que poseían la mutación *d* de BR, presente en el cv. Micro-Tom. Para estudiar la influencia de los BR sobre el fenotipo de ramificación comparamos la aparición de ramas laterales entre líneas portadoras o no del alelo dominante *D* para la síntesis de BR (Tabla RII.8).

En las plantas MT-D las ramas laterales aparecen antes que en Micro-Tom (MT) (Figura RII.13A, B), sugiriendo que la presencia de BR tiene un efecto inductor en el desarrollo de los brotes laterales. Tanto en los híbridos F1 como en las líneas transgénicas se aprecia el retraso en la aparición de las ramas laterales, comparado con el parental MT-D, aunque en el caso de los híbridos F1 el efecto es menor y presentan un fenotipo intermedio respecto a sus dos parentales.

Tabla RII.8. Líneas empleadas en el análisis del patrón de ramificación.

Línea	Nº	Características genotípicas y fenotípicas
MT	12	Cultivar Micro-Tom. Deficiencia brasinosteroides (mutación en el gen <i>DWARF</i> , alelo <i>d</i>) (Martí <i>et al</i> , 2006)
MT-D	12	Línea isogénica de MT con alelo <i>D</i> silvestre. Sin deficiencia de brasinosteroides (Carvalho <i>et al</i> , 2011)
L1	12	Líneas transgénica <i>35S::shRNA2ox</i> . Silenciamiento de genes de enzimas catabólicas
L5	12	<i>SIGA2ox</i> y deficiencia de brasinosteroides (alelo <i>d</i> procedente del cv. Micro-Tom)
L1-D	12	Híbridos F1 líneas transgénicas <i>35S::shRNA2ox</i> L1 y L5 con MT-D. Silenciamiento de
L5-D	12	genes de enzimas catabólicas <i>SIGA2ox</i> y genotipo <i>Dd</i> para brasinosteroides.

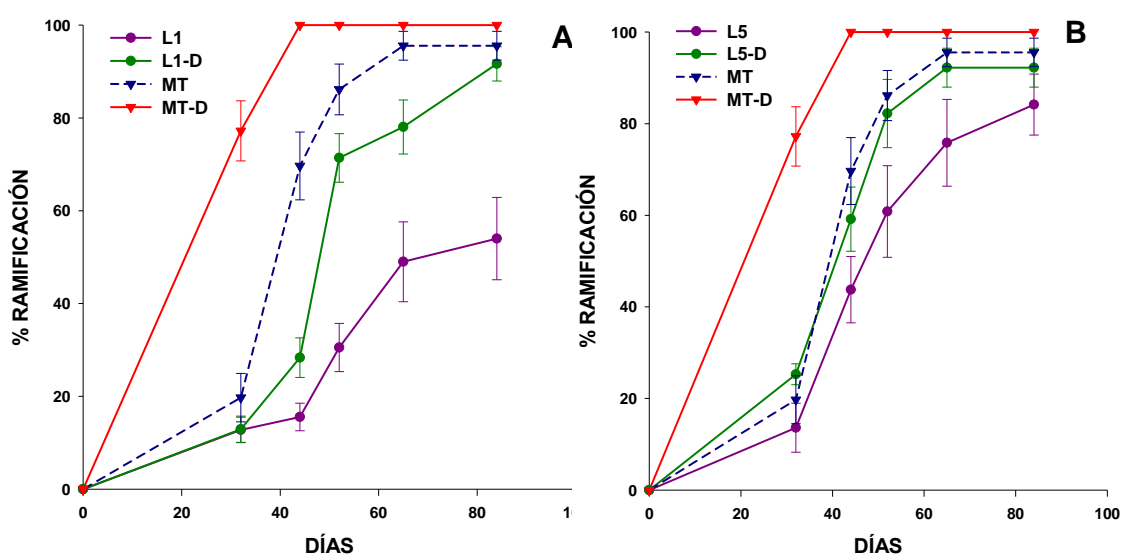


Figura RII.13. Evolución temporal de la aparición de ramas en Micro-Tom (MT), MT-D, las líneas transgénicas L1 y L5 e híbridos F1 L1-D y L5-D. Los datos aparecen representados como Media ± SE del porcentaje de axilas con ramas ≥ 0.5 cm respecto al número total de axilas de la planta.

A: MT-D, MT, L1 y L1-D; B: MT-D, MT, L5 y L5-D.

4.2 Desarrollo reproductivo

4.2.1 Floración

Las GAs actúan como reguladores del proceso de floración, tanto regulando la transición floral como la correcta formación de los órganos florales. El efecto sobre la transición floral no es el mismo en todas las especies, en algunas especies como *Arabidopsis thaliana* actúa provocando adelanto de la floración en condiciones de día corto (Blázquez *et al*, 1998) y en otras especies como tomate (García-Hurtado *et al*, 2012) y uva (Boss and Thomas, 2002) actúa retrasando la floración. Hemos estudiado el tiempo de floración y el número de flores que aparecen en las dos primeras inflorescencias de la planta y no encontramos diferencias significativas entre las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* y el silvestre (Tabla RII.9).

Tabla RII.9. Transición floral y número de flores en las líneas transgénicas *35S::shRNA2ox* L1 y L5.
Los datos se representan como Media ± SE. Los días hasta la antesis son el número de días que transcurren desde la puesta en invernadero hasta que la primera flor llega a la antesis.

Parámetro	WT	L1	L5
Nº de flores en las dos primeras inflorescencias	13,4 ± 0,3	12,8 ± 0,7	13,4 ± 0,5
Días hasta la antesis	31,3 ± 1,2	32,0 ± 0,7	29,4 ± 0,5

4.2.2 Caracterización del fruto en las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox*

La formación del fruto es un proceso muy importante y complejo en el desarrollo de las plantas, que en tomate depende de GAs, entre otros factores (Serrani *et al*, 2007a). Para determinar el efecto que el silenciamiento de los genes *SIGA2ox* pudiera tener sobre la formación del fruto analizamos algunas características de los 8 primeros frutos producidos por las líneas transgénicas y las plantas silvestres como el peso, número de semillas y lóculos por fruto y el tiempo que tardan en madurar. Tal como se muestra en la Tabla RII.10 las líneas transgénicas producen de forma espontánea una mayor cantidad de frutos partenocárpicos que el silvestre. El número de semillas por fruto en el caso de la línea L1 es menor que en el silvestre, pero esto no es así en la línea 5. También observamos que el tamaño promedio de los frutos producidos por las plantas transgénicas resultaba menor que el de los frutos de las plantas silvestres, quizás debido al mayor número de frutos partenocárpicos, que suelen ser más pequeños. No observamos diferencias en el número de lóculos ni en los días que transcurren hasta la maduración de los frutos.

Tabla RII.10. Características de los frutos de las líneas transgénicas *35S::shRNA2ox* L1 y L5.
Los datos aparecen representados como Media ± SE y corresponden a los primeros 8 frutos maduros de cada planta (10 plantas por línea). Los días hasta la maduración son los días que transcurren desde la puesta en invernadero hasta que el primer tomate de la planta alcanza la madurez (alcanza color rojo)
***, significativamente diferente del silvestre (P<0.05)**

Parámetro	WT	L1	L5
Días hasta la maduración	81,63±0,84	83,60±0,79	82,60±0,77
Frutos partenocárpicos por planta (%)	3,52±1,91	27,50±5,30*	32,50±5,93*
Número de semillas por frutos	22,14±1,23	11,63±1,39*	18,98±2,02
Peso de los frutos (g)	4,39±0,14	3,62±0,23*	3,23±0,21*
Número de loculos por fruto.	2,92±0,04	3,13±0,08	3,05±0,07

4.2.3 Producción total de frutos por las plantas transgénicas

35S::shRNA2ox

Analizamos el número total de frutos producidos por las plantas transgénicas y el silvestre en un período de dos meses. En este caso también se repite que las plantas transgénicas producen una mayor cantidad de frutos partenocárpicos espontáneamente y que los frutos producidos por la línea L1 tienen menor número de semillas por fruto (Tabla RII.11). Medimos °Brix y el jugo de los frutos producidos por la línea L1 resultó tener mayor °Brix que los frutos producidos por la línea L5 y las plantas silvestres. El valor de °Brix o contenido en sólidos solubles es parámetro relacionado con calidad del fruto que puede utilizarse como un estimador del contenido total de azúcares presentes en el fruto. Resultados obtenidos anteriormente sugieren que existe una relación inversa entre este parámetro y el número de semillas presentes en el fruto, es decir, frutos con menos semillas tienen un mayor valor de °Brix (Carmi *et al*, 2003; García-Hurtado *et al*, 2012; Carrera *et al*, 2012; Medina *et al*, 2013) y esto podría ser la explicación de las diferencias de la línea transgénica L1 que tiene menor número de semillas por fruto. No se observaron diferencias en el número de lóculos por fruto.

Tabla RII.11. Producción de frutos por las líneas transgénicas *35S::shRNA2ox* L1, L5 y silvestre.

El número total de frutos por planta corresponde al total de frutos recogidos durante 2 meses. Los otros parámetros se refieren solamente a los frutos maduros. Los °Brix se determinaron en 50 frutos por línea *, significativamente diferente del silvestre (P<0.05) (L1 N=17; L5 N=18; WT N=19). a, no diferencias significativas con el silvestre, pero sí diferencias significativas entre las líneas transgénicas (P<0.05)

Parámetro	WT	L1	L5
Número de frutos por planta ^a	46,05±2,40	43,00±2,95	53,11±3,49
Frutos partenocárpicos por planta (%)	32,23±5,14	47,27±6,78	55,51±3,38*
Número de semillas por fruto	14,50±0,67	10,66±0,58*	14,41±0,67
Peso frutos (g)	2,98±0,07	2,83±0,07	2,60±0,07*
Número de lóculos por fruto	2,81±0,02	2,88±0,03	2,88±0,03
°Brix	6,40±0,17	7,12±0,24*	6,13±0,16

4.2.4 Capacidad partenocárpica de las líneas transgénicas

35S::shRNA2ox

En tomate, el desarrollo del fruto se inicia cuando tienen lugar de forma exitosa la polinización y la fertilización. Si estos eventos no tienen lugar el crecimiento del ovario se detiene, entra en senescencia y muere; aunque en algunas ocasiones y debido a diversas causas el ovario puede crecer y desarrollarse de forma partenocárpica pese a no haber sido fecundado. Una de las causas puede ser un aumento en los niveles de GAs en el ovario, de forma natural o artificial por la introducción de un transgén como el gen de biosíntesis *GA20ox1* (García-Hurtado *et al*, 2012) o por la aplicación exógena de GAs.

Para determinar si los ovarios de las plantas transgénicas pueden desarrollarse en ausencia de polinización, emasculamos flores para evitar la autofecundación y las dejamos sin polinizar. Se escogieron las 4 primeras inflorescencias y se emascularon 3 flores por inflorescencia 2 días antes de la antesis y 22 días después se colectaron y pesaron los ovarios. Mientras los ovarios de las plantas silvestres no crecieron en ausencia de polinización (no sobrepasaron 0,1g de peso), algunos ovarios, un 5% en L1 y un 34% en L5 se desarrollaban en las líneas transgénicas, alcanzando un peso medio entre los 0,5 y 0,7g de peso (Tabla RII.12).

Tabla RII.12. Capacidad partenocárpica de las líneas transgénicas *35S::shRNA2ox* L1 y L5.

Se consideraron como frutos partenocárpicos aquellos que resultaron iguales o mayores que 0,1g. Los datos entre paréntesis son: número de frutos partenocárpicos/número total de ovarios emasculados. Los datos correspondientes a los pesos de los ovarios en día 20DPA están expresados como Media \pm SE.

Líneas	Cuajado (%)	Peso ovarios emasculados (g)	Peso frutos partenocárpicos (g)
WT	0 (0/101)	0,006 \pm 0,001	-
L1	5 (4/79)	0,031 \pm 0,016	0,52 \pm 0,2
L5	34 (35/102)	0,25 \pm 0,04	0,70 \pm 0,05

Visto que las líneas transgénicas poseían cierto grado de capacidad partenocárpica facultativa estudiamos la evolución del desarrollo de los frutos en presencia y ausencia de polinización. Para este análisis también incorporamos la línea L81. Procedimos igual que en el experimento anterior pero en este caso polinizamos manualmente algunas de las flores emasculadas y se siguió el desarrollo del ovario desde 2 días antes de las antesis hasta 20 días después. Como se muestra en la figura RII.14A, no se observan diferencias entre el silvestre y las plantas transgénicas en el desarrollo del ovario hasta el día de antesis. A partir del día de antesis y hasta el día 10 los ovarios polinizados de las líneas transgénicas resultan significativamente mayores que los ovarios de las plantas silvestres. Al cabo de 20 días se observa que se han eliminado las diferencias con el silvestre (Tabla RII.13). En el caso de los ovarios emasculados, las diferencias entre el silvestre y las líneas transgénicas empiezan a notarse a partir del día 5 pero es en el día 20 después de la antesis cuando estas diferencias se hacen más evidentes (Figura RII.14B). El peso de los ovarios emasculados en las plantas transgénicas es, al menos 30 veces mayor, que el de los ovarios emasculados en las plantas silvestres (Tabla RII.13).

Los ovarios del silvestre no se desarrollan en ausencia de polinización mientras que en las líneas transgénicas se aprecia cierto grado de capacidad partenocárpica. El número de frutos partenocárpicos producidos por las líneas transgénicas oscila entre un 15 y un 37% y éstos alcanzan un peso medio de entre un 0,59 y 0,8g (Tabla RII.13).

Tabla RII.13. Capacidad partenocárpica de líneas transgénicas L1, L5 y L81.

Se consideraron como frutos partenocárpicos aquellos que resultaron iguales o mayores que 0,1g. Los datos entre paréntesis son: número de frutos partenocárpicos/número total de ovarios emasculados. Los datos correspondientes a los pesos de los ovarios en día 20DPA están expresados como Media \pm SE.

Líneas	Cuajado (%)	Peso ovarios emasculados (g)	Peso frutos partenocárpicos (g)
WT	0 (0/69)	0,004 \pm 0,0005	-
L1	37 (11/30)	0,24 \pm 0,07	0,62 \pm 0,1
L5	15 (7/47)	0,12 \pm 0,04	0,81 \pm 0,15
L81	34 (22/64)	0,20 \pm 0,04	0,59 \pm 0,13

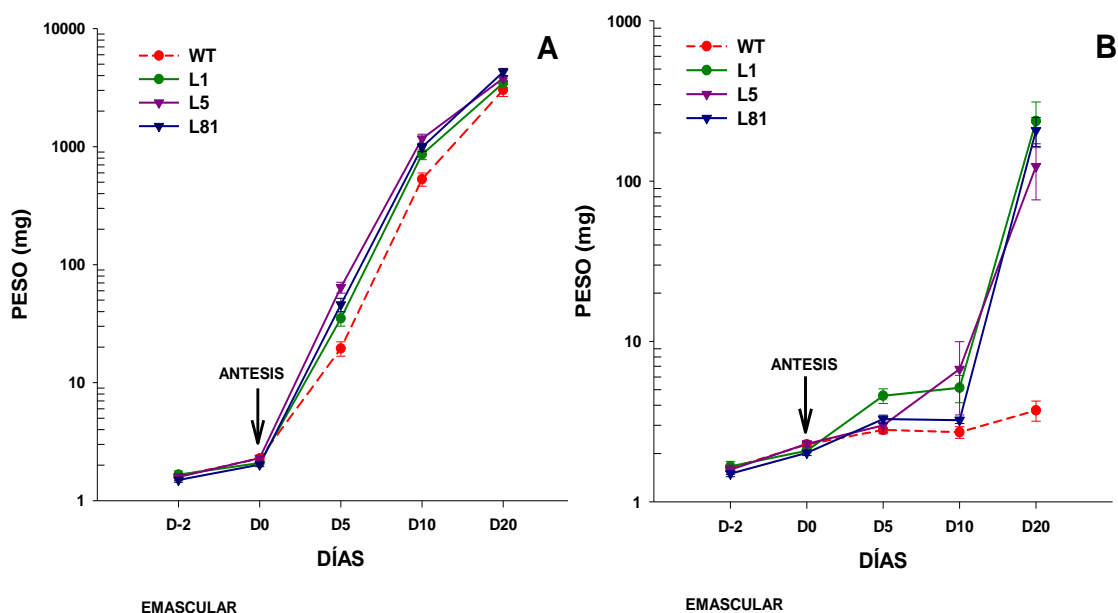


Figura RII.14. Curso temporal del desarrollo de ovarios polinizados y no polinizados en las líneas transgénicas L1, L5 y L81. Se emascularon flores 2 días antes de la antesis (D-2) para evitar la autopolinización (4 inflorescencias por planta, 3 flores por inflorescencia). Una parte de los ovarios se polinizaron manualmente 2 días después de emasculados (D0) y otros se dejaron sin polinizar. Se recogieron y pesaron ovarios en días -2, 0, 5, 10 y 20. Los valores representados son Media \pm SE.

A: Ovarios emasculados polinizados; B: Ovarios emasculados no polinizados

5. Cuantificación de niveles de giberelinas en plantas transgénicas *35S::shRNA2ox*

El transgén *35S::shRNA2ox* induce el silenciamiento de los genes *SIGA2ox* en algunos tejidos de la planta. Los enzimas *GA2ox* son enzimas de catabolismo de la ruta de síntesis de GAs, las cuales junto con los enzimas de biosíntesis controlan los niveles de GAs activas en la planta. Para evaluar el impacto del silenciamiento de los genes *SIGA2ox* en la ruta de síntesis de GAs cuantificamos los niveles de GAs en tejidos reproductivos y vegetativos de la planta.

5.1 Cuantificación de niveles de giberelinas en tejidos reproductivos

El transgén *35S::shRNA2ox* induce, en ovarios, el silenciamiento de todos los genes *SIGA2ox* (Figura RII.5) y además induce desarrollo partenocárpico parcial en los ovarios de las plantas transgénicas (Tablas RII.12 y RII.13). Como tejido reproductivo empleamos ovarios silvestres de 10 días de edad polinizados manualmente y las líneas transgénicas L1 y L5, tal como se detalla en el Capítulo de Materiales y Métodos, Apartado 4.5. La cuantificación de GAs en los ovarios mostró diferencias entre las plantas transgénicas y silvestres (Tabla RII.14). De las GAs de la ruta de la vía de la 13-hidroxilación solamente estaban elevados los niveles de GA₂₀ y disminuidos los niveles de la GA inactiva GA₈ en la línea L1. No se detectaron diferencias en ninguna de las GAs de la vía en la línea transgénica L5. En las GAs de la ruta de la no 13-hidroxilación detectamos un incremento significativo de los niveles de la GA activa GA₄. Este incremento fue de hasta 4 veces en la línea L1 y 2 veces en la línea L5. También detectamos una disminución de un 50% aproximadamente en los niveles de la GA inactiva GA₃₄ en ambas líneas transgénicas comparado con el silvestre. Tanto el aumento en los niveles de GA₄ como la disminución del nivel de GA₃₄ son efectos esperados de una disminución de la actividad catabólica de los enzimas GA2ox.

Tabla RII.14. Concentración de GAs (ng x g FW⁻¹) en ovarios polinizados de 10 días en plantas silvestres y líneas transgénicas L1 y L5. Los resultados se expresan como Media de réplicas biológicas ± SE.

*, significativamente diferente del silvestre (P<0.05)

Ruta 13-hidroxilación	WT	L1	L5
GA ₁₉	0,64 ± 0,18	0,46 ± 0,09	0,51 ± 0,11
GA ₂₀	0,35 ± 0,05	0,57 ± 0,03*	0,42 ± 0,06
GA ₁	0,30 ± 0,03	0,29 ± 0,06	0,27 ± 0,04
GA ₈	1,65 ± 0,06	1,20 ± 0,12*	1,62 ± 0,77
Ruta NO 13-hidroxilación			
GA ₄	0,36 ± 0,05	1,21 ± 0,19*	0,78 ± 0,24*
GA ₃₄	0,032 ± 0,003	0,013 ± 0,003*	0,011 ± 0,003*

5.2 Cuantificación de niveles de giberelinas en tejidos vegetativos

El transgén *35S::shRNA2ox* indujo silenciamiento en algunos tejidos vegetativos pero no en otros y también sus efectos sobre fenotipo en el desarrollo vegetativo se han localizado exclusivamente sobre la ramificación. Tomamos tres tipos diferentes de muestras de tejido vegetativo de plantas adultas, tal como se detalla en el Capítulo de Materiales y Métodos, Apartado 4.5.

Los tejidos analizados en plantas WT y línea L1 son: la porción apical de las plantas formada por el ápice y las tres hojas más jóvenes, porciones de tallo conteniendo nudos y entrenudos y axilas laterales de los nudos 3, 4 y 5. Estas muestras se colectaron luego de la aparición de las primeras flores, cuando la flor mayor de la inflorescencia era menor de 4mm. No se observaron diferencias significativas entre la línea transgénica L1 y el silvestre ni en los niveles de GAs activas ni en los precursores de GAs activas ni en los productos de su catabolismo analizados,

en las muestras tomadas de la porción apical de la plantas (Tabla RII.15). En las muestras tomadas de tallo solamente se observó una disminución significativa en los niveles del precursor GA₁₉, de la vía de la 13-hidroxilación, en las plantas transgénicas pero no se observaron incrementos ni en las GAs activas ni en las otras GAs de la vía.

Tabla RII.15. Concentración de GAs (ng x g FW⁻¹) en porción apical y tallo de plantas silvestres y la línea transgénica L1. Los resultados se expresan como Media de réplicas biológicas ± SE.

*, significativamente diferente del silvestre (P<0.05)

Ruta 13-hidroxilación	Porción apical		Tallo	
	WT	L1	WT	L1
GA ₅₃	-	-	2,66 ± 1,21	2,02 ± 0,25
GA ₄₄	-	-	1,99 ± 0,38	1,58 ± 0,16
GA ₁₉	0,08 ± 0,07	0,08 ± 0,06	1,74 ± 0,03	0,98 ± 0,12*
GA ₂₀	0,038 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,007
GA ₁	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,56 ± 0,04
GA ₈	0,54 ± 0,17	0,58 ± 0,20	1,48 ± 0,01	1,33 ± 0,02
GA ₂₉	-	-	2,18 ± 1,27	0,19 ± 0,19
Ruta NO 13-hidroxilación				
GA ₁₂	-	-	-	-
GA ₁₅	-	-	5,94 ± 1,08	6,30 ± 0,32
GA ₂₄	-	-	0,32 ± 0,02	0,24 ± 0,01
GA ₉	-	-	0,07 ± 0,04	0,04 ± 0,0
GA ₄	0,06 ± 0,05	0,09 ± 0,05	2,27 ± 0,07	2,39 ± 0,03
GA ₃₄	0,005 ± 0,002	0,013 ± 0,01	-	-
GA ₅₁	-	-	2,40 ± 0,13	2,42 ± 0,09

En cambio en las muestras de axilas sí se detectaron diferencias en el contenido de GAs (Tabla RII.16). En las axilas 4 y 5 se detectó un incremento significativo en los niveles de la GA activa GA₄. El producto de inactivación de la GA₄, la GA₃₄, no pudo ser cuantificado debido a la falta de estándar interno, que actualmente no está comercializado. Los niveles de las otras GAs inactivas (GA₈, GA₂₉ y GA₅₁), productos de la actividad de las GA2ox disminuyen hasta hacerse indetectables en las plantas transgénicas, tal como se espera del silenciamiento de los genes *SIGA2ox*. En particular la GA₂₉, que es el producto de inactivación de la GA₂₀, se hizo indetectable en todas las axilas analizadas de la línea transgénica. Curiosamente esto no dio lugar a cambios en los niveles de GA₂₀ en ninguna de las axilas, quizás debido a una autoregulación de la ruta como parecen indicar los cambios en los niveles de los precursores inmediatos (GA₁₉ y GA₄₄) que se encuentran reducidos (Tabla RII.16) en la línea transgénica L1. Tampoco la GA activa sintetizada a partir de la GA₂₀, la GA₁, mostró cambios entre la línea transgénica y la silvestre.

Tabla RII.16. Concentración de GAs (ng x g FW⁻¹) en yemas axilares de plantas silvestres y la línea transgénica L1. Los resultados se expresan como Media de réplicas biológicas ± SE.

***, significativamente diferente del silvestre (P<0.05); a: Por debajo del límite de detección.**

	3 ^{era} axila		4 ^{ta} axila		5 ^{ta} axila	
	WT	L1	WT	L1	WT	L1
GA ₅₃	4,43 ± 1,22	4,29 ± 0,17	7,89 ± 0,66	6,25 ± 0,48	7,08 ± 0,67	6,11 ± 0,25
GA ₄₄	1,78 ± 0,39	1,07 ± 0,09	2,54 ± 0,09	1,77 ± 0,26*	2,38 ± 0,08	2,17 ± 0,17
GA ₁₉	2,06 ± 0,44	0,74 ± 0,03*	2,54 ± 0,15	1,24 ± 0,10*	3,70 ± 0,20	2,78 ± 0,44
GA ₂₀	0,026 ± 0,005	0,020 ± 0,002	0,05 ± 0,008	0,02 ± 0,007	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,002
GA ₁	0,059 ± 0,006	0,069 ± 0,003	0,090 ± 0,013	0,081 ± 0,014	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,02
GA ₈	0,040 ± 0,022	a	0,092 ± 0,056	0,004 ± 0,004	0,019 ± 0,019	0,053 ± 0,028
GA ₂₉	0,026 ± 0,015	a	0,004 ± 0,003	a	0,013 ± 0,003	a
GA ₁₅	0,97 ± 0,24	0,58 ± 0,06	1,03 ± 0,30	0,98 ± 0,16	1,03 ± 0,28	0,27 ± 0,20
GA ₂₄	0,133 ± 0,035	0,058 ± 0,011	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,03
GA ₉	0,129 ± 0,013	0,121 ± 0,012	0,17 ± 0,06	0,14 ± 0,014	0,31 ± 0,03	0,17 ± 0,02*
GA ₄	0,040 ± 0,007	0,065 ± 0,010	0,083 ± 0,011	0,178 ± 0,020*	0,07 ± 0,01	0,20 ± 0,04*
GA ₅₁	0,005 ± 0,002	0,016 ± 0,008	0,007 ± 0,004	a	0,002 ± 0,002	a

DISCUSIÓN II

1. Silenciamiento de genes *SIGA2ox* en plantas transgénicas

35S::shRNA2ox

Para estudiar el o los posibles papeles de los enzimas GA2ox en el desarrollo de plantas de tomate empleamos el silenciamiento génico post-transcripcional. Puesto que la expresión de estos genes es redundante en la planta y esto a su vez podría indicar redundancia funcional decidimos silenciarlos todos. Para lograr nuestro objetivo empleamos una construcción de tipo horquilla (short-hairpin shRNA) usando un fragmento quimérico compuesto por fragmentos de los genes *SIGA2ox1*, *SIGA2ox3* y *SIGA2ox4* dispuestos en tándem, para maximizar la similitud de secuencia con toda la familia génica. Este tipo de construcción resulta muy eficiente en la inducción de silenciamiento y se ha usado anteriormente en otras especies vegetales como *A. thaliana* (Kaur *et al*, 2006), trigo (Travella *et al*, 2006; Gil-Humanes *et al*, 2008; Gil-Humanes *et al*, 2010), arroz (Miki *et al*, 2005; Pistón *et al*, 2010; Shigemitsu *et al*, 2012; Wang *et al*, 2013b), cacahuete (Chu *et al*, 2008) y *Papaver somniferum* (Allen *et al*, 2004).

En las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* observamos diferentes patrones de silenciamiento entre los tejidos analizados. En los tejidos reproductivos el silenciamiento resultó más eficiente que en los tejidos vegetativos. De seis tejidos vegetativos analizados solamente se detectó silenciamiento en tres de ellos: raíz, tallo e hipocotilo y dos de los genes de la familia (*SIGA2ox1* y *SIGA2ox2*) no resultaron silenciados en ninguno de estos tejidos (Figura RII.4). En tejidos reproductivos se lograron silenciar todos los genes de la familia (Figura RII.5). Los estadios con mayor número de genes silenciados resultaron ser los ovarios polinizados de 10 días y los emasculados de 5 días (Figura RII.5). Teniendo en cuenta que el transgén introducido lleva un promotor 35S de expresión constitutiva, estas diferencias de silenciamiento resultan sorprendentes ya que esperaríamos que los mensajeros de los genes *SIGA2ox* se redujeran en todos los tejidos de la planta. La eficiencia de silenciamiento está relacionada, principalmente, con el grado de homología entre la secuencia diana y la secuencia inductora (Katoch y Thakur, 2013). En nuestro caso, la construcción usada para silenciar contiene secuencias con una homología mayor del 90% para cada uno de los genes de la familia *SIGA2ox* y por tanto esto no debe constituir un factor determinante en la eficiencia de silenciamiento. Otro factor que se ha relacionado con la eficiencia de silenciamiento es la abundancia del mensajero que se desea silenciar, resultando más silenciados los genes de mayor expresión (Miki *et al*, 2005; Gallego-Giraldo, 2008; Gil-Humanes *et al*, 2010; Shigemitsu *et al*, 2012). Para determinar si existía una relación con la abundancia de los mensajeros diana, comparamos dicha abundancia (Figura DII.1) con el silenciamiento en los respectivos tejidos analizados y encontramos que el silenciamiento coincidía con los genes *SIGA2ox* más abundantes dentro de un mismo tejido. Es decir, en cada tejido los genes silenciados se correspondían con los de mayor expresión. Esta

correlación entre abundancia y silenciamiento también se ha detectado en la familia de las GA2ox de tabaco (Gallego-Giraldo, 2008).

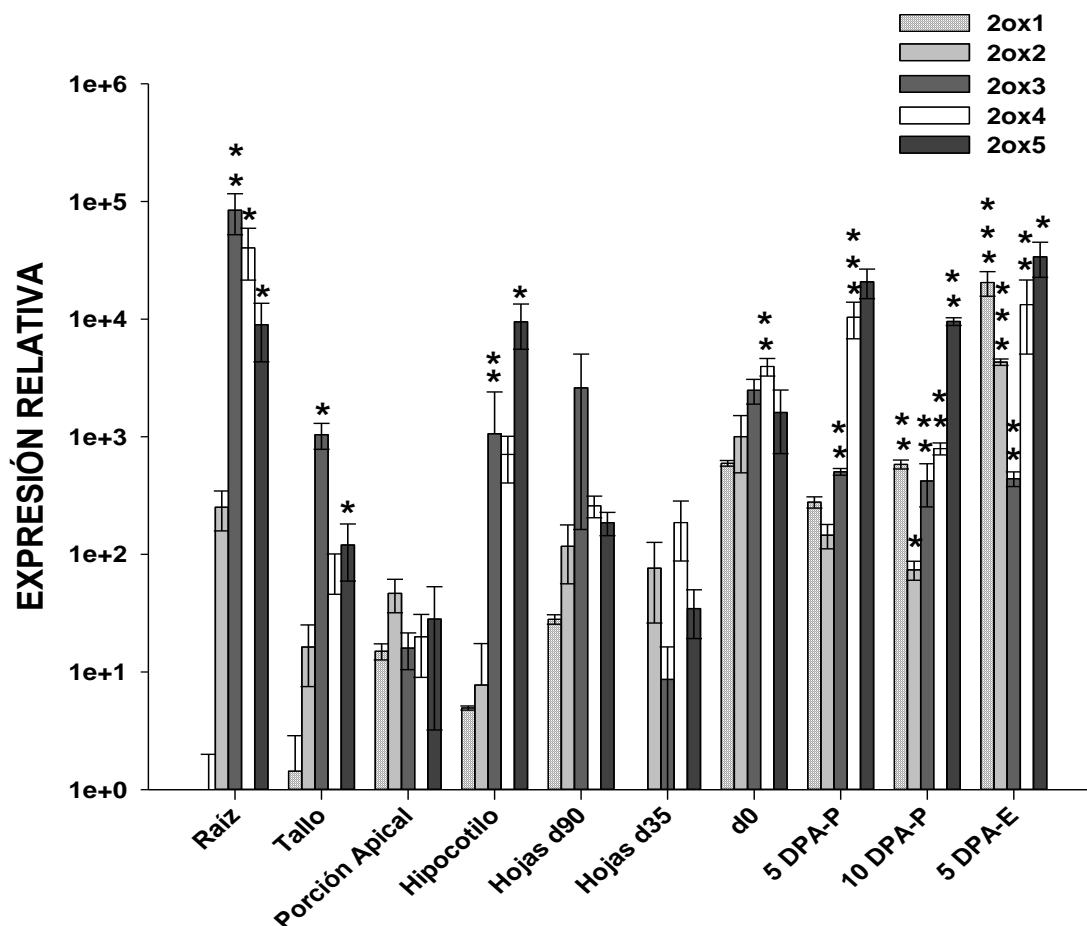


Figura DII.1. Abundancia relativa de genes *SIGA2ox* en los tejidos de plantas de tomate silvestres usados para determinar el silenciamiento en las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox*. Los tejidos analizados son: raíz de plantas adultas (90 días), tallo y porción apical de plantas jóvenes adultas (antes de la antesis), hipocotilos de plántulas de 7 días, hojas de plantas adultas de 90 días de edad (Hojas d90), hojas de plantas adultas jóvenes de 35 días de edad (Hojas d35), ovarios de flores en antesis (d0), ovarios de 5 (5DPA-P) y 10 días post-antesis (10DPA-P) polinizados y ovarios de 5 días post-antesis emasculados (5DPA-E). Los valores de expresión están referidos al valor de expresión del gen *SIGA2ox1* en raíz (1.0) y son el resultado de la media de tres réplicas biológicas \pm SE.

***: indica que el gen se ha silenciado en tres líneas; **: indica que el gen se ha silenciado en dos líneas; *: indica que el gen solo se ha silenciado en una línea.

La correlación entre abundancia del mensajero y silenciamiento se observa solo dentro de un mismo tejido y no entre tejidos diferentes. Un mismo gen que se exprese con similar abundancia en dos tejidos puede resultar silenciado en uno y en otro no. Las diferencias de silenciamiento entre tejidos pueden deberse a diferencias en los componentes de la maquinaria celular del mecanismo de silenciamiento. Recientemente en tomate se han clonado y caracterizado los componentes fundamentales de esta maquinaria celular: siete Dicers (DCL), quince Argonautas (AGO) y seis Polimerasas RNA-dependientes (RdRP) y se ha observado que la expresión de los mismos está regulada de acuerdo al tejido y el estadio (Bai *et al*, 2012; Xian *et al*, 2013). Los

tejidos con una baja eficiencia en el silenciamiento, como es el caso de las hojas, podrían tener menos activa la maquinaria específica para inducir este tipo de silenciamiento.

2. Contenido de GAs en plantas transgénicas *35S::shRNA2ox*

Para evaluar el impacto del silenciamiento de los genes *SIGA2ox* en la ruta de las GAs se cuantificaron los niveles de GAs en tejidos vegetativos y reproductivos de las plantas silvestres y transgénicas. En tallo, donde solo *SIGA2ox3* y *SIGA2ox5* estaban silenciados, no se encontraron diferencias en los niveles de GAs activas entre plantas silvestres y transgénicas (Tabla RII.15), lo cual indica que el silenciamiento de sólo dos genes no es suficiente para producir cambios significativos en las concentraciones de GAs activas. Sin embargo, en las axilas laterales se detectó un incremento de aproximadamente el doble de la concentración de la GA activa GA₄ y una disminución significativa en la concentración de las GAs inactivas GA₂₉, GA₈ y GA₅₁ (Tabla RII.16). Esto sugiere que el efecto del silenciamiento de los genes *SIGA2ox* sobre el metabolismo de GAs en tejidos vegetativos puede estar muy localizado, ya que solo se aprecian cambios en las axilas laterales de las plantas transgénicas.

A diferencia de los tejidos vegetativos, la reducción de los mensajeros de los genes *SIGA2ox* en los tejidos reproductivos resultó mucho más eficiente. Al analizar los niveles de GAs en los ovarios polinizados de 10 días observamos un incremento significativo en los niveles de la GA activa GA₄ en las plantas transgénicas y disminución de los niveles de las GAs inactivas GA₃₄ y GA₈ (Tabla RII.14). Al igual que en las axilas laterales, los efectos encontrados en el metabolismo de GAs de las plantas transgénicas son mayores sobre la rama biosintética de la no hidroxilación temprana en el C-13 (Figura I.2) y solo se altera la GA activa de esta ruta, la GA₄. Los enzimas GA 2-oxidasas catalizan varias reacciones de la ruta metabólica de GAs (Figura I.2), probablemente con diferente afinidad o eficiencia por sus sustratos. Esto podría explicar el diferente impacto que tiene el silenciamiento de los genes *SIGA2ox* sobre los sustratos GA₁ y GA₄ de forma que los niveles de GA₁ no sufren cambios y los de GA₄ se incrementan.

3. Efectos del silenciamiento de los genes *SIGA2ox* y la concentración de GAs activas en el desarrollo vegetativo de plantas transgénicas *35S::shRNA2ox*

Las GAs son reguladores importantes del desarrollo vegetativo de las plantas. Actúan promoviendo la germinación de las semillas, la elongación de hipocotilos y tallos, la expansión de las hojas y además son importantes para un adecuado desarrollo de las raíces (Mauriat *et al*, 2011; Hedden and Thomas, 2012; Niu *et al*, 2013). La consecuencia esperada de inducir el silenciamiento de los genes *SIGA2ox* es un aumento en los niveles de GAs activas. En los tejidos vegetativos de las plantas transgénicas el silenciamiento resultó escaso y los niveles de GAs solo se alteraron de forma significativa en las axilas laterales. Como consecuencia, las

plantas transgénicas no mostraron en su desarrollo vegetativo los efectos fenotípicos característicos de un aumento de GAs como son adelanto de la germinación, aumento en la longitud de hipocotilos y tallos entre otros (Figura RII.7; Tablas RII.5 y RII.6). Sin embargo, las plantas transgénicas mostraron inhibición de la ramificación, un fenotipo no esperado (Figura RII.8). Este fenotipo también se observó en plantas en las que se había incrementado la biosíntesis o respuesta a GAs (mutante *procera* y una línea transgénica de sobre-expresión del gen de biosíntesis *GA20ox1*) (Figura RII.10). Además, al reducir el nivel de GAs tratando plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* con el inhibidor de biosíntesis de giberelinas PCB, se lograba revertir completamente el fenotipo de ramificación, de transgénico a silvestre (Figura RII.12B). Esto, unido al aumento en los niveles de GA₄ encontrado en las yemas axilares, indica claramente que las GAs tienen un efecto inhibitorio en el desarrollo de ramas laterales en tomate.

La aparición y desarrollo de ramas laterales constituye una parte esencial de la arquitectura de la planta. Este proceso se encuentra regulado por varios factores hormonales y ambientales. Hasta la fecha el modelo de regulación hormonal de la ramificación no incluye las GAs (Figura DII.2), sino a las hormonas auxinas y estrigolactonas como inhibidoras y a las citoquininas como estimuladoras (Dun *et al*, 2012; Cheng *et al*, 2013).



Figura DII.2. Modelo de regulación hormonal del desarrollo de brotes laterales (Cheng *et al*, 2013)

Sin embargo, nuestros resultados apoyan la inclusión de las GAs en este modelo como reguladores negativos del crecimiento de yemas axilares. Este papel de las GAs en la ramificación también es apoyado por otros datos descritos anteriormente en diversas especies vegetales:

1. Plantas transgénicas enanas, que sobre-expresan enzimas GA2ox, de arroz (Lo *et al*, 2008), *Paspalum notatum* (Agharkar *et al*, 2007) y álamo (Mauriat *et al*, 2011) producen más ramas laterales que las plantas silvestres.
2. Mutantes enanos de guisante (de Saint Germain *et al*, 2013) y cítricos (Fagoaga *et al*, 2007) deficientes en los enzimas de biosíntesis GA3ox o GA20ox también producen más ramas laterales que las plantas silvestres.

3. En el mutante *procera*, un mutante de tomate de respuesta constitutiva a GAs (pérdida de función de la proteína *SIDELLA*) el crecimiento de las axilas más viejas está reprimido (Bassel *et al*, 2008).

En *Arabidopsis thaliana* las GAs también se han asociado con el desarrollo de las ramas laterales pero a diferencia de las otras especies mencionadas anteriormente, aquí actúan estimulando la ramificación. En un quintuple mutante de pérdida de función de enzimas GA2ox, en condiciones de día corto (SD) el crecimiento de las axilas laterales está significativamente aumentado y las ramas laterales resultan más largas que en las plantas silvestres. En condiciones de día largo (LD) no se apreciaron estas diferencias fenotípicas (Rieu *et al*, 2008). Es conocido que las GAs pueden regular el mismo proceso de desarrollo de forma diferente de acuerdo a la especie. Por ejemplo la transición floral en *A.thaliana*, en condiciones SD, se induce por GAs, pero en especies como tomate y guisante las GAs retrasan la transición floral. Esto podría indicar que la acción de las GAs sobre la ramificación, al igual que sobre la floración, puede ser diferente en *Arabidopsis* y tomate ya que nuestros resultados sugieren que en tomate el efecto de las GAs sobre el crecimiento de las ramas laterales es inhibitorio.

La participación de las GAs como reguladores negativos en el modelo de regulación hormonal de la ramificación podría llevarse a cabo de diversas formas:

- I. Un aumento de las GAs estimularía las auxinas que son inhibitorias de la ramificación. Esta hipótesis se sostiene en el hecho de que plantas transgénicas de sobre-expresión de enzimas GA2ox en álamo, que producen más ramas que las plantas silvestres y en las cuales hay una reducción significativa de los niveles de GAs activas, también se aprecia una reducción significativa en el transporte y en los niveles de auxinas (Mauriat *et al*, 2011).
- II. El aumento de GAs estimularía las estrigolactonas que también son inhibitorias de la ramificación. Sin embargo, en guisante, análisis recientes sugieren que el efecto de estas hormonas sobre la ramificación es aditivo y que actúan independientemente (de Saint Germain *et al*, 2013).
- III. El aumento de GAs inhibiría las citoquininas que son estimuladoras del crecimiento de las ramas laterales. Interacciones de este tipo han sido descritas anteriormente pero no asociadas a la ramificación (Fleishon *et al*, 2011).
- IV. Un aumento de las GAs causaría directamente una inducción del gen *BRC1*, el cual es un represor de la ramificación en varias especies vegetales incluido tomate (Aguilar-Martínez *et al*, 2007; Martín-Trillo *et al*, 2011; Cheng *et al*, 2013; Chen *et al*, 2013).

También es posible que el efecto de las GAs sobre la ramificación sea un efecto conjunto de interacción con más de uno de los componentes de la regulación del crecimiento de las yemas laterales. Este trabajo abre una nueva e interesante línea de investigación dentro de la regulación hormonal de la ramificación que merece sin duda ser abordada en trabajos futuros.

3.1 Influencia de los brasinosteroides en el patrón de ramificación en las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox*

El cultivar de tomate usado en este trabajo fue el cultivar Micro-Tom (MT). Este es un cultivar enano de crecimiento determinado y que presenta una mutación en el gen *DWARF (D)* que codifica para un enzima que cataliza el paso de 6-deoxocastasterona a castasterona en la ruta de biosíntesis de BR (Bishop *et al*, 1999). Esta mutación (d) es responsable de la deficiencia de BR en la planta y en Micro-Tom se ha observado que las respuestas a GAs están influidas negativamente por este déficit de BR (Martí *et al*, 2006). Para determinar si el fondo genético del cv. Micro-Tom (dd) era determinante en el fenotipo de ramificación encontrado, cruzamos las líneas transgénicas L1 y L5 (genotipo dd) con la línea isogénica de MT (MT-D) la cual tiene el alelo *D* silvestre en homocigosis (DD) y analizamos la aparición de ramas en los híbridos F1 (genotipo Dd). La primera observación al comparar MT con MT-D (Figura RII.13) fue que la presencia de BR induce la ramificación. En los híbridos L1-D y L5-D se sigue apreciando inhibición sobre la ramificación, cuando se compara con el parental más ramificado. Esto sugiere que el efecto inhibitorio sobre la ramificación mediado por las GAs en tomate no depende de BR puesto que la presencia o ausencia de esta hormona no impide el proceso inhibitorio. La posible interacción entre ambas hormonas en el control de la ramificación no ha sido abordada con profundidad en este trabajo y queda pendiente de análisis más detallados en estudios posteriores.

4. Efectos del silenciamiento de los genes *SIGA2ox* y la concentración de GAs activas en el desarrollo reproductivo de plantas transgénicas *35S::shRNA2ox*

Las GAs también son muy importantes en el desarrollo reproductivo de tomate. Las GAs actúan modulando la transición floral aunque su acción varía de acuerdo a la especie (Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009). En plantas transgénicas de sobre-expresión del gen de biosíntesis *GA20ox1* y en el mutante *procera* se ha observado que en tomate las GAs actúan retrasando la floración (García-Hurtado *et al*, 2012; Carrera *et al*, 2012). Sin embargo en nuestras líneas transgénicas *35S::shRNA2ox* no observamos diferencias en el tiempo de floración ni en el número de flores que aparecen en las dos primeras inflorescencias (Tabla RII.9). Tampoco hemos detectado diferencias significativas en los niveles de GAs activas en la porción apical de plantas con la floración iniciada (Tabla RII.15). Esto sugiere que los enzimas *GA2ox* en tomate no son importantes en la regulación de los niveles de GAs en el meristemo apical o que debido a la redundancia en la expresión de los genes *SIGA2ox* los niveles de GAs no han sido alterados de forma significativa.

Las GAs también son esenciales para el cuajado y desarrollo de los frutos en tomate. La manipulación de los niveles de GAs en el ovario, ya sea por sobre-expresión del gen de

biosíntesis *GA20ox1* o por aplicación exógena de GA_3 , produce un aumento significativo en la capacidad partenocárpica de los ovarios (Serrani *et al*, 2007a; García-Hurtado *et al*, 2012). En las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox*, cuando se impide de forma mecánica la fertilización de la flor, los ovarios de las plantas transgénicas crecen hasta 30 veces más que los ovarios de las plantas silvestres. Además, un cierto número de ovarios transgénicos se desarrolla como frutos partenocárpicos (Tablas RII.12 y RII.13). El transgén *35S::shRNA2ox* produjo una reducción significativa en los niveles de mRNA de todos los genes *SIGA2ox* en ovarios de varios estadios en las plantas transgénicas (Figura RII.5). También, se confirmó un aumento significativo en los niveles de la GA activa GA_4 en los ovarios polinizados de las líneas transgénicas L1 y L5 (Tabla RII.14). Estos resultados apoyan la teoría de que el aumento de la capacidad partenocárpica en las líneas transgénicas sea consecuencia de un incremento significativo de los niveles de GAs activas, ocasionado a su vez por el silenciamiento de los genes *SIGA2ox*.

También se analizó el desarrollo temporal de ovarios polinizados y no polinizados para estudiar en qué momento del desarrollo podían detectarse diferencias entre plantas transgénicas y silvestres, observándose que antes del día de antesis no existían diferencias significativas en el desarrollo (Figura RII.14). Luego de la antesis, los ovarios polinizados de las plantas transgénicas se hacen significativamente más grandes que los de las plantas silvestres, pero 20 días después de la antesis las diferencias de desarrollo desaparecen (Figura RII.14A). Las diferencias observadas en el desarrollo temprano del ovario entre plantas transgénicas y silvestres se pueden relacionar con el incremento detectado en los niveles de GAs 10 días después de la polinización (Tabla RII.14). Estas diferencias posiblemente desaparecen en etapas posteriores, debido a que la síntesis de GAs que se produce en los óvulos fertilizados podría ocultar el pequeño efecto causado por el silenciamiento de los genes *SIGA2ox*. En las plantas silvestres, los ovarios no polinizados mantienen un crecimiento muy reducido (Figura RII.14B), mientras que los ovarios transgénicos aumentan progresivamente su tamaño de forma significativa, llegando a ser 30 veces más grandes que los silvestres 20 días después de la antesis, presumiblemente como consecuencia del mayor contenido de GA_4 .

Cuando analizamos la expresión de los genes de la familia *SIGA2ox* durante el desarrollo de los ovarios observamos que dos de los genes de la familia (*SIGA2ox1* y *SIGA2ox2*) presentan un patrón diferente en ovarios polinizados y no polinizados (Figura RI.2 B,C). Estos genes se inducen en ovarios no fertilizados y por el contrario se reprimen en ovarios polinizados, lo cual los convierte en candidatos potenciales para actuar como reguladores negativos del crecimiento del ovario. El aumento de los niveles de GAs y de la capacidad partenocárpica, observados en los ovarios transgénicos podría estar, al menos en parte, mediado por el silenciamiento de estos dos genes.

Las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* también producen un mayor número de frutos sin semillas que las plantas silvestres a partir de flores autopolinizadas (Tabla RII.10). Esto sugiere

que un número de flores en las que (por diversas circunstancias) el cuajado fallaría y no darían frutos en el silvestre sí dan lugar a frutos en las plantas transgénicas debido a su mayor capacidad partenocárpica. Todos estos resultados sugieren, como conclusión, que los enzimas GA2ox en tomate son importantes reguladores de los niveles de GAs en los primeros estadios del desarrollo del ovario.

CONCLUSIONES II

1. La construcción *35S::shRNA2ox* silencia los cinco genes *SIGA2ox* en tejidos vegetativos y reproductivos aunque con diferente eficiencia.
2. La eficiencia de silenciamiento está relacionada con la abundancia de los transcritos diana resultando silenciados los más abundantes en cada tejido.
3. El silenciamiento de los genes *SIGA2ox* produjo un incremento significativo en los niveles de la GA activa GA₄ en ovarios y yemas axilares de las plantas transgénicas pero no en tallos ni en la porción apical.
4. En las plantas transgénicas el incremento de los niveles de GAs en los ovarios se asocia con un mayor crecimiento de los ovarios y cierto grado de desarrollo partenocárpico (5-37%).
5. Las GAs tienen un efecto inhibitorio sobre la ramificación de tomate ya que las plantas transgénicas con incrementos en los niveles de GAs presentan menos ramificación y este fenotipo es revertido inhibiendo su biosíntesis.
6. Las GA 2-oxidasas son importantes en el control de la ramificación mediado por GAs ya que su silenciamiento produce un incremento de la GA activa GA₄ en yemas axilares e inhibe la aparición de ramas laterales en las plantas transgénicas.
7. El efecto inhibitorio de las GAs sobre la ramificación no depende del déficit de BR en el cultivar Micro-Tom.

***CAPÍTULO III: SILENCIAMIENTO DE GEN SIGA2_{ox1} EN
PLANTAS DE TOMATE***

RESULTADOS III

1. Obtención del transgén 35S::amiRNA2ox1

El gen *SIGA2ox1* junto con el gen *SIGA2ox2* tienen su expresión inducida en ovarios emasculados y reprimida en ovarios polinizados (Figura RI.2B, C) lo que sugiere un papel en la regulación de las GAs que controlan el crecimiento del ovario. Además, *SIGA2ox1* se expresa mayoritariamente en tejidos reproductivos y mucho menos en tejidos vegetativos (Figura RI.1). Con el objetivo de estudiar el posible papel del gen *SIGA2ox1* en el desarrollo del tomate recurrimos nuevamente al silenciamiento génico. En este caso escogimos una construcción tipo microRNA artificial (amiRNA). Para la obtención de la construcción amiRNA2ox1, se siguió el protocolo recomendado por Schwab *et al*, 2005, tal como se explica en el capítulo de Materiales y Métodos, apartado 3.2, Figura M.2. Para la selección del fragmento amiRNA2ox1 usamos la plataforma gratuita de diseño de amiRNAs WMD (Web-based amiRNA designer), la cual funciona para más de 100 especies vegetales. Para cada gen que se desee silenciar, WMD genera un listado de posibles amiRNA y los ordena de los más a los menos idóneos de acuerdo a los parámetros establecidos por defecto (Schwab *et al*, 2006; Ossowski *et al*, 2008). En nuestro caso seleccionamos una secuencia de amiRNA ubicada en la región codificante del gen *SIGA2ox1*, antes del codón de parada tal como se aprecia en la figura RIII.1, con un alto grado de similitud a la secuencia del gen diana y que se encontraba entre los candidatos señalados como idóneos por el programa WMD. Además, se seleccionó esta secuencia por encontrarse en una región donde el gen *SIGA2ox1* no presenta una alta similitud de secuencias con los otros genes *SIGA2ox*.

La secuencia seleccionada fue:

5'- TGAGTTGATATTTATAGGCCA-3'

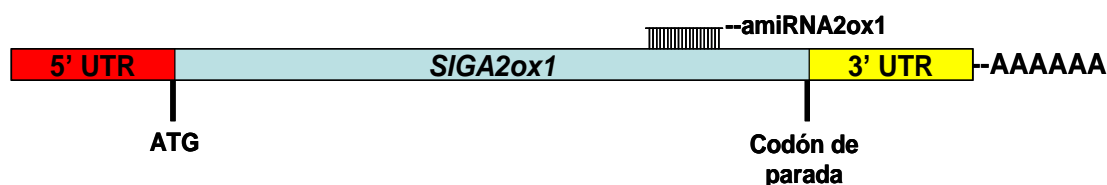


Figura RIII.1. Representación esquemática de la ubicación del amiRNA2ox1 en la secuencia del gen *SIGA2ox1*.

Una vez obtenido el fragmento amiRNA2ox1 de 682pb aproximadamente se clonó en el vector pGEM-T Easy. Se seleccionaron los clones positivos usando PCR, se purificó el DNA plasmídico y se envió a secuenciar. Al hacer el análisis de las secuencias se pudo constatar que el cassette del amiRNA2ox1 había quedado conformado correctamente y que no existían errores en las secuencias. Se tomó el fragmento amiRNA2ox1 y se clonó primero en el vector pDNOR 221 y finalmente se clonó el fragmento amiRNA2ox1 en el vector pK2GW7, bajo el control del promotor 35S, por recombinación LR tal como se describe en el Capítulo Materiales y Métodos. Con esta construcción final se transformó *A.tumefaciens* LBA 4404 y se verificó por PCR. Una

vez se obtuvo un clon de *A.tumefaciens* que portara la construcción *35S::amiRNA2ox1* se procedió a transformar tomate de forma estable.

2. Obtención de plantas de tomate transgénicas *35S::amiRNA2ox1*

Para estudiar los posibles efectos del silenciamiento del gen *SlGA2ox1* en tomate transformamos genéticamente de forma estable plantas de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom con la construcción *35S::amiRNA2ox1*. Los experimentos de transformación genética se llevaron a cabo, al igual que con el transgén *35S::shRNA2x*, mediante cocultivo de explantes de hojas con la cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* y el método de transformación descrito por Ellul *et al*, 2003 tal como se detalla en el capítulo de Materiales y Métodos.

Luego de 3 semanas de la inoculación con la cepa de *A. tumefaciens* portadora de la construcción *35S::amiRNA2ox1* comenzaron a formarse callos resistentes a la kanamicina en la zona de corte de los explantes. Posteriormente, cada 3-4 semanas aproximadamente se subcultivaron los callos en medio organogénico. En cada subcultivo se eliminaron las zonas necróticas del callo para facilitar el desarrollo de las estructuras organogénicas y brotes adventicios que fueron apareciendo a lo largo del proceso de transformación. Al cabo de 12-13 semanas se individualizaron los brotes y se cultivaron en medio de enraizamiento con el antibiótico kanamicina (100 mg/L) para permitir la adecuada elongación del tallo y el desarrollo del sistema radicular. Cuando las plantas alcanzaron un desarrollo adecuado se llevaron a condiciones de invernadero para su aclimatación y posterior análisis.

2.1 Eficacia de transformación

La eficacia de transformación, estimada por el número de plantas independientes obtenidas respecto al total de explantes inoculados fue del 2,2%, tal como se muestra en la tabla RIII.1

Tabla RIII.1. Tasa efectiva de transformación y total de plantas independientes obtenidas *in vitro*.

Nº EXPLANTES INOCULADOS	TOTAL PLANTAS INDEPENDIENTES DIPLOIDES	TASA EFECTIVA TRANSFORMACIÓN (%)
274	6	2,2

El número de transformantes obtenidos al final del experimento resultó bajo debido a una baja tasa de regeneración de los explantes, entre otras causas.

2.2 Amplificación fragmento *amiRNA2ox1* en plantas transgénicas TG1

Para detectar la presencia del transgén *35S::amiRNA2ox1* en plantas, usamos la técnica de PCR con los oligos attB1 *amiRNA2ox1* y attB2 *amiRNA2ox1* de acuerdo a las condiciones descritas en el capítulo de Materiales y Métodos apartado 4.3. Como controles empleamos el plásmido pK2GW7 con el fragmento *amiRNA2ox1* insertado (control positivo) y el DNA de plantas

silvestres (control negativo), además del control negativo de reacción. Observamos que tanto en el DNA de las plantas transgénicas analizadas como en el control positivo se producía amplificación del fragmento *amiRNA2ox1* de aproximadamente 500pb y en las plantas silvestres no se producía amplificación del fragmento, como se esperaba (Figura RIII.2). Este resultado confirma que las plantas obtenidas en el proceso de transformación son portadoras del transgén *35S::amiRNA2ox1*.

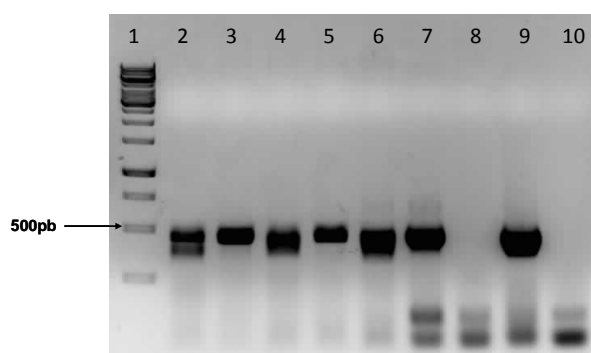


Figura RIII.2. Amplificación del fragmento *amiRNA2ox1* a partir del DNA genómico de plantas transgénicas TG1 resistentes a kanamicina. Carril 1: Patrón de Masas Moleculares GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); Carril 2: Línea 3; Carril 3: Línea 6; Carril 4: Línea 11; Carril 5: Línea 12; Carril 6: Línea 13; Carril 7: Línea 17; Carril 8: Planta silvestre sin transformar; Carril 9: Control positivo de reacción (plásmido pK2GW7 + fragmento *amiRNA2ox1*); Carril 10: Control negativo de reacción.

2.3 Segregación del gen *nptII* en la TG1

De las 6 líneas TG1 llevadas a condiciones de invernadero y portadoras de la construcción *35S::amiRNA2ox1*, solamente 5 cumplían la proporción 3:1 de Resistentes:Sensibles (correspondiente a una sola inserción en un locus): L3, L11, L12, L13 y L17 y una de ellas (L6) cumplía una proporción de 1:1 (Tabla RIII.2). Se desechó la línea L6 y se utilizaron las líneas restantes para seleccionar plantas homocigotas. Para los experimentos posteriores de caracterización fisiológica se seleccionaron las líneas L11, L12 y L13.

Tabla RIII.2. Segregación gen *nptII* en TG1.

LÍNEA	RESISTENTES	SENSIBLES	TOTAL	PROPORCIÓN	X ² CALCULADO	P
3	34	14	48	3:1	0,444	0.5
6	29	23	52	1:1	0,692	0.45
11	41	9	50	3:1	1,307	0.25
12	26	9	35	3:1	0,010	0.9
13	20	7	27	3:1	0,012	0.9
17	33	9	42	3:1	0,286	0.6

3. Evaluación de silenciamiento de gen *SIGA2ox1* en plantas transgénicas *35S::amiRNA2ox1*

El transgén *35S::amiRNA2ox1* tiene como objetivo reducir la expresión del gen *SIGA2ox1* en la planta, induciendo el silenciamiento génico. Para evaluar la eficacia de la construcción *35S::amiRNA2ox1* analizamos el silenciamiento del gen *SIGA2ox1* en tejidos vegetativos y reproductivos. Como tejidos vegetativos seleccionamos plántulas enteras de 11 días y la quinta hoja de plantas adultas de 45 días. Como tejidos reproductivos usamos flores en antesis y ovarios polinizados de 10 y 20 días de edad. En los tejidos vegetativos seleccionados solo observamos una reducción significativa de la expresión del gen *SIGA2ox1* en plántulas y hojas de la línea L13 (Figura RIII.3A, B). En los tejidos reproductivos detectamos silenciamiento significativo del gen *SIGA2ox1* en las flores en antesis y en los ovarios polinizados de 10 días pero en los ovarios polinizados de 20 días no observamos silenciamiento en ninguna de las líneas transgénicas analizadas (Figura RIII.3A, B). En los casos donde se detectó silenciamiento del gen *SIGA2ox1*, la expresión se redujo entre el 38 y el 72% (Tabla RIII.3). Los valores de expresión aparecen resumidos en el apartado de Anexos en la Tabla S3

Tabla RIII.3. Resumen análisis del silenciamiento del gen *SIGA2ox1* en las líneas transgénicas L11, L12 y L13. Los porcentajes expresados se refieren al porcentaje de silenciamiento del gen en ese tejido. NS: No silenciado.

TEJIDOS	LÍNEAS		
	L11	L12	L13
Plántulas	NS	NS	57,6%
Hojas	NS	NS	72%
d0	54%	67,7%	68,9%
p+10	68,6%	61,3%	38,3%
p+20	NS	NS	NS

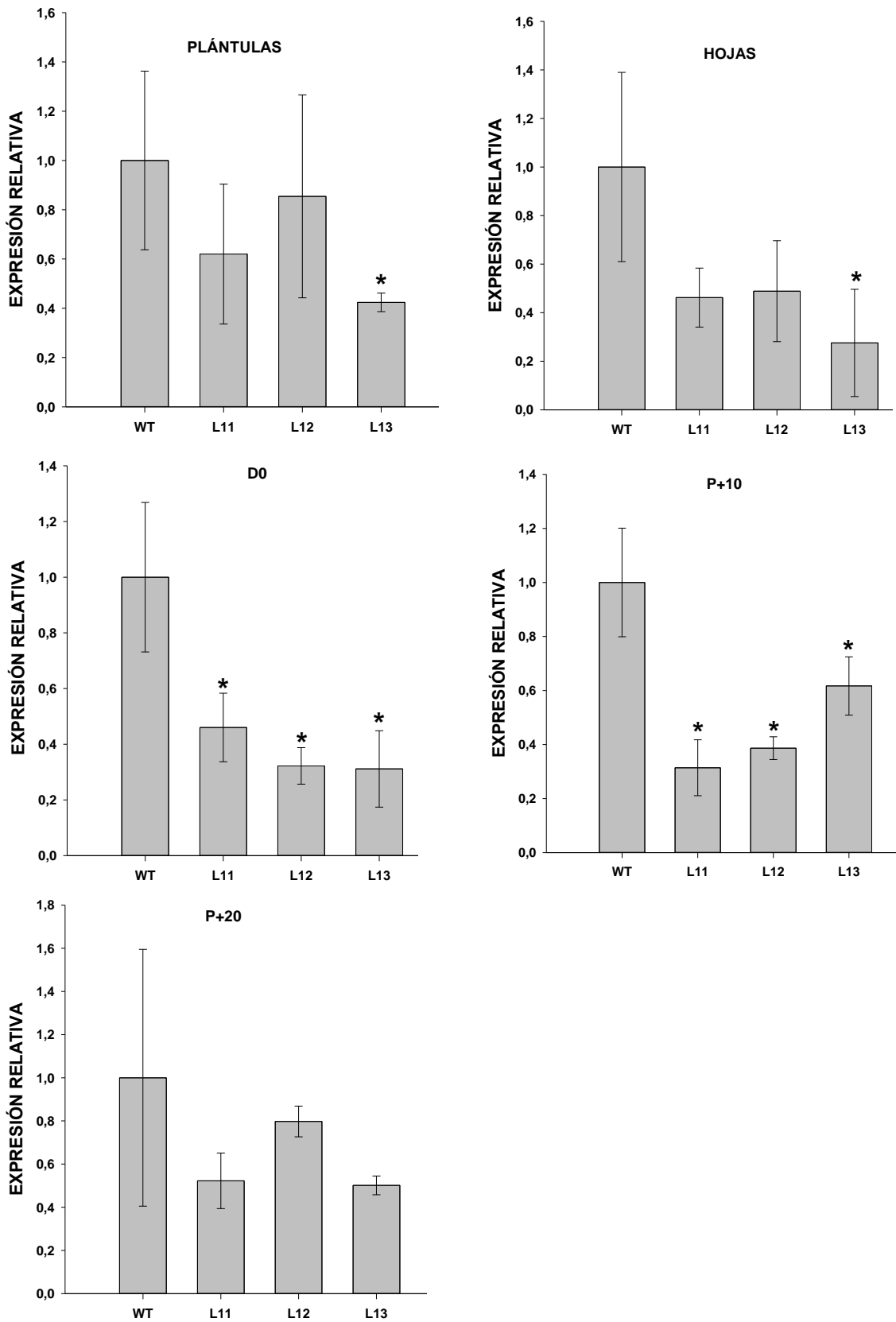


Figura RIII.3. Expresión relativa del gen *SIGA2ox1* en plantas transgénicas *35S::amiRNA2ox1*
Plántulas: Plántulas de 11 días; **Hojas:** Quinta hoja de plantas adultas de 45 días; **D0:** Flores en antesis (D0);
P+10: Ovarios polinizados de 10 días; **P+20:** Ovarios polinizados de 20 días. Los valores de expresión son
relativos al valor de expresión en las plantas silvestres (1.0) y son el resultado de la media de tres réplicas
biológicas \pm STD
*, significativamente diferente del silvestre ($P < 0.05$)

4. Evaluación de características fenotípicas en plantas transgénicas

35S::amiRNA2ox1

El transgén *35S::amiRNA2ox1* reduce significativamente la expresión del gen *SIGA2ox1* en ovarios de tomate y tiene poco efecto en los tejidos vegetativos ya que solo se silencia significativamente en plántulas y hojas de la línea L13. Al igual que con las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* se evaluaron varios caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas transgénicas *35S::amiRNA2ox1* obtenidas.

4.1 Desarrollo vegetativo

4.1.1 Longitud de hipocotilo y raíz en plántulas

Al igual que sucede con la germinación, las GAs regulan la longitud del hipocotilo y de las raíces en las plántulas (Collett *et al*, 2000; García-Hurtado *et al*, 2012). Al medir la longitud de los hipocotilos en las líneas transgénicas no observamos diferencias significativas con el silvestre en las líneas L12 y L13 (Tabla RIII.4). Los hipocotilos de las plántulas de la línea L11 resultaron significativamente más largos que los del silvestre. En la longitud de las raíces no observamos diferencias significativas en las líneas L11 y L12, pero las raíces de las plántulas de la línea L13 resultaron más cortas que las de las plantas silvestres. Estos resultados son los esperados del escaso silenciamiento en estos tejidos (Figura RIII.3).

Tabla RIII.4. Longitud hipocotilos y raíces de plántulas de 11 días.

Los datos aparecen representados como Media± SE; WT (N=32); L11 (N=36); L12 (N=35); L13 (N=36)

*, significativamente diferente del silvestre (P<0.05)

Línea	Longitud de hipocotilo (cm)	Longitud de raíz (cm)
WT	1,62±0,03	4,84±0,24
L11	1,74±0,04*	4,76±0,17
L12	1,72±0,02	4,38±0,13
L13	1,62±0,03	3,84±0,12*

4.1.2 Morfología plantas adultas

Las GAs promueven la elongación de los entrenudos del tallo. Un efecto fenotípico asociado con una mayor cantidad de GAs activas en la planta es un alargamiento de los entrenudos del tallo, resultando en plantas más altas con tallos más finos. En las líneas transgénicas estudiamos, en dos experimentos independientes, caracteres del desarrollo vegetativo como la altura de la planta, el grosor del tallo y longitud del entrenudo así como el tamaño y número de folíolos de la quinta hoja. En el primer experimento (experimento 1) no encontramos diferencias significativas en la altura total de las plantas pero sí en el número de hojas que aparecen antes de la primera inflorescencia en las líneas L12 y L13 (Tabla RIII.5). También encontramos diferencias en el área de la quinta hoja, en todas las líneas transgénicas ésta resultó ser significativamente menor que en las plantas silvestres. En todas las líneas transgénicas tanto la

longitud como el ancho de la quinta hoja fue menor que en las plantas silvestres. En el segundo experimento (experimento 2), las líneas L12 y L13 resultaron ser significativamente más altas que las plantas silvestres y al igual que en el primer experimento apareció un número de hojas significativamente mayor antes de la primera inflorescencia. No se observaron diferencias significativas en el diámetro del tallo de las líneas transgénicas. En la longitud de entrenudo tampoco observamos diferencias significativas en las líneas L12 y L13, pero el entrenudo las plantas de la línea L11 resultó ser significativamente más corto que los de las plantas silvestres. A diferencia del primer experimento no se observaron diferencias en el tamaño de la quinta hoja, aunque en este experimento la quinta hoja de las plantas transgénicas poseían un mayor número de folíolos que las plantas silvestres.

Tabla RIII.5. Características fenotípicas del desarrollo vegetativo de las líneas transgénicas L11, L12, L13 y silvestre. Los datos aparecen representados como Media \pm SE. En ambos experimentos el diámetro del tallo y la longitud del entrenudo se midieron en el quinto entrenudo. El área de hoja y el número de folíolos corresponden a la quinta hoja en los dos experimentos.

	Experimento 1			
Parámetro	WT	L11	L12	L13
Altura hasta primera inflorescencia (cm)	11,85 \pm 0,67	10,85 \pm 0,42	13,70 \pm 0,40	13,90 \pm 0,58
Número de hojas hasta primera inflorescencia	6,69 \pm 0,27	6,9 \pm 0,18	7,70 \pm 0,15*	7,50 \pm 0,17*
Diámetro del tallo (cm)	0,59 \pm 0,01	0,59 \pm 0,02	0,59 \pm 0,01	0,62 \pm 0,01
Longitud de entrenudo (cm)	2,57 \pm 0,29	2,17 \pm 0,13	2,43 \pm 0,09	2,17 \pm 0,07
Área de hoja (cm ²)	268,49 \pm 10,92	191,36 \pm 16,64*	194,58 \pm 9,06*	196,18 \pm 13,09*
Número de folíolos	6,10 \pm 0,28	7,0 \pm 0,00	7,0 \pm 0,00	6,9 \pm 0,10
	Experimento 2			
Parámetro	WT	L11	L12	L13
Altura hasta primera inflorescencia (cm)	11,81 \pm 0,34	11,78 \pm 0,55	14,28 \pm 0,37*	15,35 \pm 0,31*
Número de hojas hasta primera inflorescencia	6,50 \pm 0,17	6,67 \pm 0,31	7,90 \pm 0,18*	7,60 \pm 0,16*
Diámetro del tallo (cm)	0,61 \pm 0,02	0,60 \pm 0,00	0,60 \pm 0,00	0,61 \pm 0,01
Longitud de entrenudo (cm)	2,90 \pm 0,27	2,48 \pm 0,14*	2,56 \pm 0,15	2,90 \pm 0,15
Área de hoja (cm ²)	226,84 \pm 18,90	212,08 \pm 6,96	207,17 \pm 15,42	211,83 \pm 6,83
Número de folíolos	5,60 \pm 0,27	6,42 \pm 0,28*	6,90 \pm 0,10*	7,0 \pm 0,00*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ambos experimentos, las diferencias encontradas podrían ser atribuidas en su mayor parte a diferencias en las condiciones ambientales del invernadero y no a la presencia del transgén.

4.1.3 Hábito de crecimiento y patrón de ramificación

El cultivar Micro-Tom presenta un patrón de crecimiento determinado, con abundante ramificación en las etapas posteriores a la floración. Teniendo en cuenta que en las líneas

transgénicas *35S::shRNA2ox* se detectó inhibición de la ramificación, también estudiamos este fenotipo en las plantas transgénicas *35S::amiRNA2ox1*. En las líneas transgénicas *35S::amiRNA2ox1*, no se observó inhibición en la aparición de las ramas laterales (Figura RIII.4).

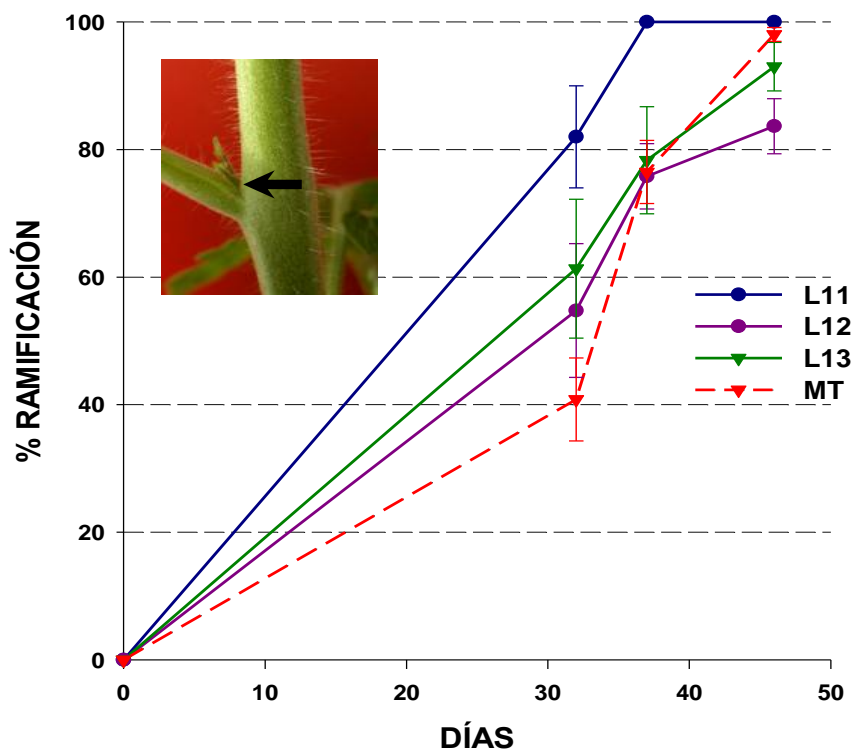


Figura RIII.4. Evolución temporal de la aparición de ramas en las líneas transgénicas L11, L12, L13 comparado con las plantas silvestres (cv Micro-Tom). Los datos aparecen representados como Media \pm SE del porcentaje de axilas con ramas \geq 0.5 cm respecto al número total de axilas de la planta.

4.2 Desarrollo reproductivo

4.2.1 Floración

Las GAs actúan regulando la transición floral y la correcta formación de los órganos florales. El efecto sobre la transición floral difiere entre especies, en algunas como *Arabidopsis thaliana* las GAs provocan adelanto de la floración en condiciones de día largo (Blázquez *et al*, 1998) y en otras especies como tomate (García-Hurtado *et al*, 2012) y uva (Boss and Thomas, 2002) retrasan la transición floral. Como se observa en la Tabla RIII.5, dos de las líneas transgénicas (L12 y L13) presentaban un ligero aumento en el número de hojas antes de la aparición de la primera inflorescencia. Sin embargo, en cuanto al tiempo de floración (días hasta la antesis) no encontramos diferencias entre las plantas transgénicas y el silvestre (Tabla RIII.6). El número de flores en las primeras inflorescencias fue significativamente menor en la línea L11 comparado con el silvestre pero no se encontraron diferencias con las otras dos líneas.

Tabla RIII.6. Transición floral y número de flores en las líneas transgénicas L11, L12, L13 y silvestre. Los datos se representan como Media \pm SE. Los días hasta la antesis son el número de días que transcurren desde la puesta en invernadero como semilla hasta que la primera flor llega a la antesis.

Parámetro	WT	L11	L12	L13
Número de flores en las dos primeras inflorescencias	15,3 \pm 0,33	10,5 \pm 0,73*	14,9 \pm 0,55	14,2 \pm 0,66
Días hasta la antesis	33,4 \pm 0,25	32,4 \pm 0,24	33,6 \pm 0,15	33,2 \pm 0,17

4.2.2 Caracterización del fruto en las plantas transgénicas

35S::amiRNA2ox1

La formación del fruto es un proceso muy importante y complejo en el desarrollo de las plantas en el cual las GAs son claves (Serrani *et al*, 2007a). En las líneas transgénicas analizamos algunas características de los 8 primeros frutos como peso, número de semillas y lóculos. También, analizamos los días que transcurren desde la puesta en invernadero hasta la aparición de los frutos maduros así como el total de frutos producidos por las plantas en un período de 40 días aproximadamente. Los resultados se muestran en la Tabla RIII.7.

Tabla RIII.7. Características de los frutos de las líneas transgénicas L11, L12, L13 y silvestre.

Los datos aparecen representados como Media \pm SE. El número total de frutos de la planta corresponde a todos los frutos recogidos durante un período de 40 días. El resto de los datos corresponden a los primeros 8 frutos maduros de cada planta. Los días hasta la maduración son los días que transcurren desde la puesta en invernadero hasta que el primer tomate de la planta alcanza la madurez

*, significativamente diferente del silvestre (P<0.05)

Parámetro	WT	L11	L12	L13
Días hasta la maduración	54,7 \pm 1,66	48,9 \pm 1,45*	48,7 \pm 0,54*	50,8 \pm 0,66
Número total de frutos por planta	38,10 \pm 3,93	28,9 \pm 2,02	32,3 \pm 3,61	30,78 \pm 3,67
Frutos partenocárpicos por planta (%)	43,75 \pm 8,79	50,0 \pm 8,12	66,25 \pm 6,73	38,8 \pm 9,94
Número de semillas por frutos	20,20 \pm 1,82	12,5 \pm 1,92*	18,85 \pm 2,54	20,77 \pm 2,28
Peso de los frutos (g)	3,20 \pm 0,20	3,61 \pm 0,19	3,11 \pm 0,21	3,67 \pm 0,22
Número de loculos por fruto.	3,06 \pm 0,06	3,23 \pm 0,07	2,90 \pm 0,06	3,00 \pm 0,06
°Brix	6,10 \pm 0,12	7,17 \pm 0,13*	6,96 \pm 0,16*	5,78 \pm 0,14

No detectamos diferencias significativas en el peso y número de lóculos del fruto entre las plantas transgénicas y el silvestre (Tabla RIII.7). Tampoco encontramos diferencias en el número de frutos partenocárpicos, aunque la línea L11 produce menos semillas por fruto que el silvestre. En estos frutos también analizamos los °Brix y el jugo de los tomates producidos por las líneas L11 y L12 resultaron tener significativamente un valor de °Brix mayor que los del silvestre.

En estas plantas transgénicas de las líneas L11 y L12 observamos cierto adelanto en la aparición de los frutos maduros pero no observamos diferencias en el número total de frutos producidos por planta entre las plantas transgénicas y el silvestre.

4.2.4 Capacidad partenocárpica de las líneas transgénicas

35S::amiRNA2ox1

Para determinar si los ovarios de las plantas transgénicas pueden desarrollarse en ausencia de polinización emasculamos las flores para evitar la autofecundación y las dejamos sin polinizar. Se escogieron las 4 primeras inflorescencias y se emascularon 3 flores por inflorescencia 2 días antes de la antesis y 22 días después se colectaron y pesaron los ovarios. Esto se realizó en tres experimentos independientes, para tener en cuenta la variabilidad ambiental, cuyos resultados se muestran en la Tabla RIII.8.

En dos de los experimentos una pequeña cantidad de ovarios de las plantas silvestres presentó cierto grado de desarrollo, sobrepasando los 0,1g de peso pero en ningún caso sobrepasaron los 0,22g de peso promedio (Tabla RIII.8). En cambio, los resultados de las líneas transgénicas resultaron variables entre los experimentos. En el primer experimento, en todas las líneas transgénicas se desarrollaron entre un 20 y un 30% de los ovarios emasculados y éstos resultaron significativamente mayores que los ovarios emasculados de las plantas silvestres. Sin embargo en el segundo y tercer experimento, sólo la línea L11 mostraba diferencias significativas con el silvestre en el desarrollo partenocárpico de los ovarios.

Tabla RIII.8. Capacidad partenocárpica de líneas transgénicas 11, 12, 13 y silvestre.

Se consideraron como ovarios partenocárpicos aquellos que resultaron iguales o mayores que 0.1g. Los datos entre paréntesis son: número de frutos partenocárpicos/número total de ovarios emasculados. Los datos correspondientes a los pesos están expresados como Media \pm SE.

*, significativamente diferente del silvestre (P<0.05)

	Líneas	Cuajado (%)	Peso ovarios emasculados (g)	Peso frutos partenocárpicos (g)
Experimento I	WT	5,5 (8/146)	0,016 \pm 0,004	0,22 \pm 0,03
	L11	28 (19/67)	0,25 \pm 0,06*	0,85 \pm 0,11*
	L12	20 (15/76)	0,08 \pm 0,02	0,39 \pm 0,06
	L13	30 (19/63)	0,10 \pm 0,02	0,31 \pm 0,05
Experimento II	WT	2,4 (2/82)	0,011 \pm 0,003	0,14 \pm 0,004
	L11	30 (22/74)	0,109 \pm 0,03*	0,33 \pm 0,03
	L12	2 (1/58)	0,011 \pm 0,005	0,27 \pm 0,0
	L13	8 (6/74)	0,027 \pm 0,01	0,27 \pm 0,02
Experimento III	WT	0 (0/232)	0,003 \pm 0,0003	-
	L11	5 (8/151)	0,049 \pm 0,02*	0,87 \pm 0,20
	L12	0,70 (1/143)	0,004 \pm 0,001	0,18 \pm 0,0
	L13	0 (0/147)	0,003 \pm 0,0003	-

5. Cuantificación de niveles de giberelinas en plantas transgénicas

35S::amiRNA2ox1

El transgén *35S::amiRNA2ox1* induce el silenciamiento del gen *SIGA2ox1* en algunos tejidos de la planta. Para evaluar el impacto de la reducción en los niveles del transcrito *SIGA2ox1* en la ruta de síntesis de GAs cuantificamos algunas GAs en ovarios de 10 días polinizados manualmente. No se observaron diferencias entre las líneas transgénicas y el silvestre en los niveles de GAs activas (Tabla RIII.9), sugiriendo que solamente el silenciamiento de uno de los genes de la familia pudiera no ser suficiente para producir un aumento significativo en los niveles de hormona en la planta. Las diferencias encontradas en algunas GAs inactivas o en sus precursores podrían deberse a la autorregulación de las rutas de síntesis inducida para mantener la homeostasis de GAs.

Tabla RIII.9. Concentración de GAs (ng x g FW⁻¹) en ovarios polinizados de 10 días en plantas silvestres y líneas transgénicas L11, L12 y L13. Los resultados se expresan como Media de réplicas biológicas ± SE.

*, significativamente diferente del silvestre (P<0.05)

Ruta 13-hidroxilación	WT	L11	L12	L13
GA ₅₃	0,78 ± 0,07	1,15 ± 0,09	0,97 ± 0,12	0,75 ± 0,12
GA ₄₄	0,40 ± 0,09	0,75 ± 0,16	0,58 ± 0,02	0,52 ± 0,02
GA ₁₉	8,80 ± 0,95	21,66 ± 2,24*	17,08 ± 1,61*	16,45 ± 1,79*
GA ₂₀	5,67 ± 0,99	8,33 ± 1,44	6,50 ± 0,45	5,78 ± 0,83
GA ₁	2,18 ± 0,18	3,26 ± 0,59	2,93 ± 0,14	2,61 ± 0,26
GA ₈	7,10 ± 0,95	11,80 ± 1,94	9,07 ± 1,14	8,95 ± 1,50
GA ₂₉	4,23 ± 0,19	7,25 ± 0,44*	5,00 ± 0,83	5,07 ± 0,58
Ruta NO 13-hidroxilación				
GA ₁₅	2,23 ± 0,12	5,00 ± 0,80	3,78 ± 0,67	3,86 ± 0,69
GA ₂₄	0,38 ± 0,04	0,65 ± 0,08	0,51 ± 0,07	0,50 ± 0,12
GA ₉	1,63 ± 0,23	1,34 ± 0,22	1,17 ± 0,09	0,74 ± 0,10*
GA ₄	4,25 ± 0,61	4,77 ± 1,41	4,35 ± 0,39	3,16 ± 0,31
GA ₅₁	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,005	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,01

DISCUSIÓN III.

1. Silenciamiento del gen *SIGA2ox1* en plantas transgénicas

35S::amiRNA2ox1

El patrón de expresión de los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2* (Figura RI.2B,C) sugiere un posible papel de estos genes como reguladores negativos del crecimiento de ovarios no polinizados y de los dos genes, el gen *SIGA2ox1* parecía estar más implicado en el desarrollo reproductivo ya que se expresa mucho menos en tejidos vegetativos (Figura RI.1). Para tratar de identificar la función de uno de los genes de la familia, escogimos el gen *SIGA2ox1* empleando también el silenciamiento génico post-transcripcional mediante una construcción tipo micro-RNA artificial (amiRNA). Este tipo de construcciones, al igual que los shRNA, se han usado ampliamente para inducir silenciamiento en tomate (Álvarez *et al*, 2006) y otras especies vegetales tales como *Arabidopsis thaliana* (Trigueros *et al*, 2009; Eamens *et al*, 2011; Gómez *et al*, 2011; Rueda-Romero *et al*, 2012), arroz (Warthmann *et al*, 2008; Butardo *et al*, 2011), berenjena (Toppino *et al*, 2011), tabaco (Álvarez *et al*, 2006) y álamo (Shi *et al*, 2010). La construcción *35S::amiRNA2ox1* resultó eficiente en el silenciamiento del gen *SIGA2ox1* aunque al igual a lo observado en las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox*, el silenciamiento resultó más eficiente en los tejidos reproductivos que en los vegetativos (Figura RIII.3, Tabla RIII.3). De nuevo comprobamos que existe relación entre la abundancia del mensajero diana y el silenciamiento, tal como se ilustra en la Figura DIII.1, donde se representan las abundancias relativas y se resaltan los tejidos donde se da silenciamiento. Esto no se cumple en ovarios polinizados de 20 días probablemente porque, en ocasiones, las diferencias entre tejidos puedan ser más importantes que las diferencias entre las abundancias de la diana, como ya se vio en el capítulo anterior (Figura DII.1)

Cuando comparamos los valores de silenciamiento del gen *SIGA2ox1*, alcanzados con ambas construcciones en un mismo tejido (ovarios polinizados de 10 días), observamos que la reducción alcanzada por la construcción *35S::amiRNA2ox1* (38-69%; Tabla RIII.3) no era significativamente diferente de la alcanzada con la construcción *35S::shRNA2ox* (49-84%; Tabla RII.4). Esto indica que ambos métodos de silenciamiento han sido igualmente eficientes.

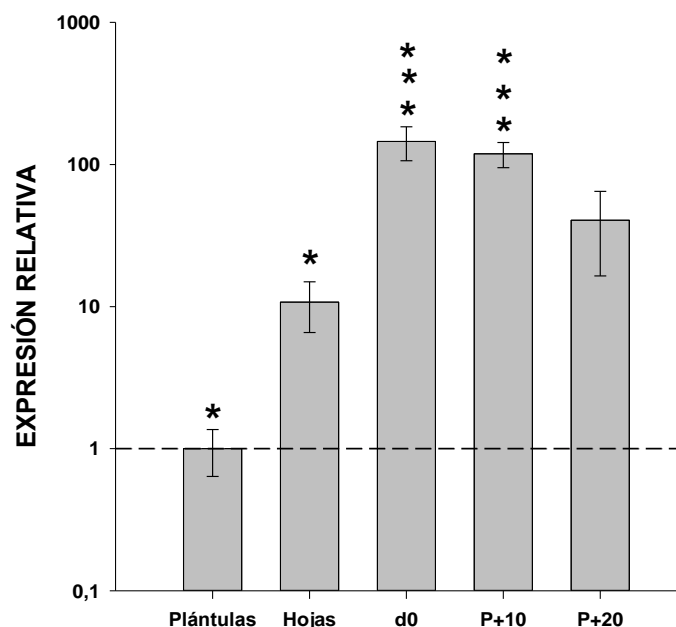


Figura DIII.1. Abundancia relativa de gen *SIGA2ox1* en los tejidos de plantas de tomate silvestres usados para determinar el silenciamiento en las plantas transgénicas *35S::amiRNA2ox1*. Los tejidos analizados son: Plántulas: plántulas de 11 días; Hojas: Quinta hoja de plantas adultas jóvenes de 45 días de edad, d0: flores en antesis, P+10: ovarios polinizados de 10; P+20: ovarios polinizados de 20 días. Los valores de expresión están referidos al valor de expresión del gen *SIGA2ox1* en plántulas (1.0) y son el resultado de la media de tres réplicas biológicas \pm STD.

***: indica que el gen se ha silenciado en tres líneas; **: indica que el gen se ha silenciado en dos líneas; *: indica que el gen solo se ha silenciado en una línea.

2. Efectos del silenciamiento del gen *SIGA2ox1* en los contenidos de GAs y en el desarrollo de las plantas transgénicas *35S::amiRNA2ox1*

Con el objetivo de determinar si el silenciamiento de un único gen de la familia *SIGA2ox* era suficiente para producir cambios en el metabolismo de GAs, se cuantificaron sus niveles en ovarios polinizados de 10 días de las líneas transgénicas *35S::amiRNA2ox1*. Aunque las muestras de ovarios polinizados presentaban una reducción significativa de la expresión del gen *SIGA2ox1* en todas las líneas analizadas (Figura RIII.3) no se observaron diferencias en los contenidos de GAs activas (Tabla RIII.9) en relación al silvestre, a diferencia de lo observado en las plantas transgénicas *35S::shRNA2ox* donde se apreciaba un aumento significativo de los niveles de GA₄ en ovarios (Tabla RII.14). Esto indica que la inactivación de un solo gen no resulta suficiente para producir un incremento en los niveles de GAs activas.

Los fenotipos observados en el desarrollo reproductivo de las plantas transgénicas *35S::amiRNA2ox1* resultaron variables y poco reproducibles puesto que no se observaron fenotipos que se repitieran en todas las líneas ni en todos los experimentos. Solamente una de las líneas transgénicas *35S::amiRNA2ox1* mostró cierta capacidad partenocárpica en tres experimentos independientes (Tabla RIII.8). Esto, junto con la ausencia de cambios detectables en los niveles de GAs en los frutos, nos permite concluir que el silenciamiento de este único

gen, probablemente debido a la redundancia génica, produce efectos tan pequeños que no da lugar a un fenotipo reproducible. En resumen, el análisis fenotípico del desarrollo reproductivo de las plantas transgénicas *35S::amiRNA2ox1* sugiere que además de redundancia en la expresión también existe redundancia funcional entre los genes *SIGA2ox*.

El silenciamiento del gen *SIGA2ox1* en tejidos vegetativos de plantas *35S::amiRNA2ox1* fue poco eficiente ya que solo era detectado en una de las tres líneas transgénicas (Figura RIII.3). El desarrollo vegetativo de dichas plantas no presentaba diferencias reproducibles con el silvestre, incluyendo el retraso en la aparición de las ramas laterales (Figura RIII.4) que si ocurría en las plantas de silenciamiento múltiple *35S::shRNA2ox*. Estos resultados sugieren que, o bien este gen no tiene ningún papel en la regulación de las GAs que controlan la ramificación, o bien que este papel no es detectado debido a la redundancia génica.

CONCLUSIONES III

1. El transgén *35S::amiRNA2ox1* ha sido eficiente en silenciar el gen *SIGA2ox1* en varios tejidos aunque la eficiencia de silenciamiento no resultó superior a la inducida por el transgén *35S::shRNA2ox*.
2. La eficiencia de silenciamiento de la construcción *35S::amiRNA2ox1* también está relacionada con la abundancia del transcrito diana siendo más silenciado el gen *SIGA2ox1* en aquellos tejidos donde es más abundante.
3. El silenciamiento del gen *SIGA2ox1* no produjo cambios significativos en los niveles de GAs de las plantas transgénicas ni efectos fenotípicos significativos.

CONCLUSIONES FINALES

1. Los genes *SIGA2ox* se expresan de forma redundante a lo largo del desarrollo vegetativo y reproductivo de tomate con diferentes abundancias relativas.
2. La expresión de los genes *SIGA2ox* en plántulas no está regulada por variaciones en los niveles endógenos de GAs activas.
3. El patrón de expresión de los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2* en ovarios sugiere que podrían tener un papel como reguladores negativos de su crecimiento probablemente reduciendo los niveles de GAs activas en ovarios no fertilizados.
4. Las construcciones *35S::shRNA2ox* y *35S::amiRNA2ox1* lograron reducir los niveles de expresión de los genes diana en varios tejidos de la planta resultando más eficientes cuanto más abundantes son los mensajeros.
5. El silenciamiento del gen *SIGA2ox1* no produjo cambios significativos en los niveles de GAs activas y sus efectos sobre el fenotipo de plantas transgénicas fueron débiles y poco reproducibles probablemente debido a la redundancia génica.
6. Los enzimas GA 2-oxidasas son importantes en la regulación de los niveles de GAs en el ovario. El silenciamiento de los 5 genes *SIGA2ox* en las plantas transgénicas produce incrementos significativos en los niveles de la GA activa GA₄ y esto se asocia con un mayor crecimiento de los ovarios y un cierto grado de desarrollo partenocárpico (5-37%).
7. Las GAs tienen un efecto inhibitorio sobre la ramificación de tomate. Este efecto parece estar mediado por los enzimas GA 2-oxidasas, puesto que su silenciamiento induce el aumento de la GA activa GA₄ en yemas axilares e inhiben la aparición de ramas laterales en las plantas transgénicas.

APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

En el presente trabajo se han obtenido líneas de tomate transgénicas en las que, al silenciar genes que codifican enzimas de catabolismo de GAs, se produce un incremento en la capacidad partenocárpica sin otros efectos fenotípicos no deseados. La obtención de frutos partenocárpicos manipulando el metabolismo o las respuestas a GAs se ha conseguido anteriormente por otras estrategias como la sobre-expresión de un gen de biosíntesis (*GA20ox*) y mutación o silenciamiento del represor de respuestas a GAs DELLA. Sin embargo estas estrategias no resultan tan ventajosas ya que conllevan un fenotipo muy pleiotrópico donde todas las respuestas a GAs están activadas (mayor altura y retraso del tiempo de floración entre otras). La producción de frutos sin semillas en tomate es de gran interés en la industria puesto que facilita la elaboración de productos procesados de tomate como salsas y zumos. La capacidad partenocárpica de tomate también resulta muy útil para los agricultores puesto que permite obtener frutos aún en condiciones climatológicas adversas como por ejemplo bajas temperaturas, donde no se completan exitosamente los procesos de polinización y fertilización

ANEXOS

ANEXOS

Tabla S1. Valores de expresión relativa de genes *SIGA2ox* en tejidos vegetativos de plantas silvestres y líneas transgénicas *35S::shRNA2ox*. Todos los valores de expresión están referidos al valor de expresión promedio de cada gen en las plantas silvestres (WT) y son el resultado de la media de tres réplicas biológicas \pm STD.

***, significativamente diferente del silvestre ($P < 0.05$)**

Tejidos vegetativos													
	Raíz							Hipocotilo					
Genes	WT	L1	L5		Genes	WT	L1	L5		Genes	WT	L1	L5
GA2ox1	-	-	-		GA2ox1	1,00 \pm 0,09	2,07 \pm 1,09	3,12 \pm 0,76*		GA2ox1	1,00 \pm 0,09	2,38 \pm 0,30*	0,92 \pm 0,41
GA2ox2	1,00 \pm 0,37	0,52 \pm 0,15	2,52 \pm 1,54		GA2ox2	1,00 \pm 0,47	1,84 \pm 1,48	0,54 \pm 0,09		GA2ox2	1,00 \pm 0,52	0,54 \pm 0,06	0,41 \pm 0,12
GA2ox3	1,00 \pm 0,38	0,15 \pm 0,01*	0,42 \pm 0,08*		GA2ox3	1,00 \pm 0,14	0,11 \pm 0,08*	0,18 \pm 0,06*		GA2ox3	1,00 \pm 0,94	0,04 \pm 0,04	0,05 \pm 0,02
GA2ox4	1,00 \pm 0,46	0,32 \pm 0,05*	1,35 \pm 0,82		GA2ox4	1,00 \pm 0,40	0,59 \pm 0,08	1,50 \pm 1,35		GA2ox4	1,00 \pm 0,21	0,54 \pm 0,10	0,90 \pm 0,42
GA2ox5	1,00 \pm 0,52	0,31 \pm 0,09*	1,82 \pm 0,87		GA2ox5	1,00 \pm 0,21	0,31 \pm 0,14*	0,88 \pm 0,38		GA2ox5	1,00 \pm 0,22	0,43 \pm 0,17	1,34 \pm 1,26
	Tallo							Hojas d90					
Genes	WT	L1	L5		Genes	WT	L1	L5		Genes	WT	L1	L5
GA2ox1	1,00 \pm 1,00	0,17 \pm 0,05	-		GA2ox1	1,00 \pm 0,09	2,38 \pm 0,30*	0,92 \pm 0,41		GA2ox1	-	-	-
GA2ox2	1,00 \pm 0,54	0,55 \pm 0,37	-		GA2ox2	1,00 \pm 0,52	0,54 \pm 0,06	0,41 \pm 0,12		GA2ox2	1,00 \pm 0,66	0,23 \pm 0,03	0,69 \pm 0,23
GA2ox3	1,00 \pm 0,25	0,19 \pm 0,17*	-		GA2ox3	1,00 \pm 0,94	0,04 \pm 0,04	0,05 \pm 0,02		GA2ox3	1,00 \pm 0,89	0,05 \pm 0,02	0,44 \pm 0,54
GA2ox4	1,00 \pm 1,20	0,06 \pm 0,06	-		GA2ox4	1,00 \pm 0,21	0,54 \pm 0,10	0,90 \pm 0,42		GA2ox4	1,00 \pm 0,53	0,48 \pm 0,08	0,77 \pm 0,35
GA2ox5	1,00 \pm 0,51	0,08 \pm 0,05*	-		GA2ox5	1,00 \pm 0,22	0,43 \pm 0,17	1,34 \pm 1,26		GA2ox5	1,00 \pm 0,44	0,79 \pm 0,12	0,34 \pm 0,15
	Porción apical							Hojas d35					
Genes	WT	L1	L5		Genes	WT	L1	L5		Genes	WT	L1	L5
GA2ox1	1,00 \pm 0,16	0,93 \pm 0,57	-		GA2ox1	-	-	-		GA2ox1	-	-	-
GA2ox2	1,00 \pm 0,32	0,80 \pm 0,52	-		GA2ox2	1,00 \pm 0,66	0,23 \pm 0,03	0,69 \pm 0,23		GA2ox2	1,00 \pm 0,66	0,23 \pm 0,03	0,69 \pm 0,23
GA2ox3	1,00 \pm 0,34	0,44 \pm 0,15	-		GA2ox3	1,00 \pm 0,89	0,05 \pm 0,02	0,44 \pm 0,54		GA2ox3	1,00 \pm 0,89	0,05 \pm 0,02	0,44 \pm 0,54
GA2ox4	1,00 \pm 0,55	0,55 \pm 0,15	-		GA2ox4	1,00 \pm 0,53	0,48 \pm 0,08	0,77 \pm 0,35		GA2ox4	1,00 \pm 0,53	0,48 \pm 0,08	0,77 \pm 0,35
GA2ox5	1,00 \pm 0,58	0,50 \pm 0,11	-		GA2ox5	1,00 \pm 0,44	0,79 \pm 0,12	0,34 \pm 0,15		GA2ox5	1,00 \pm 0,44	0,79 \pm 0,12	0,34 \pm 0,15

Tabla S2. Valores de expresión relativa de genes *SIG2ox* en tejidos reproductivos de plantas silvestres y líneas transgénicas *35S::shRNA2ox*. Todos los valores de expresión están referidos al valor de expresión promedio de cada gen en las plantas silvestres (WT) y son el resultado de la media de tres réplicas biológicas \pm STD.

*, significativamente diferente del silvestre ($P < 0.05$)

Tejidos reproductivos				
D0				
Genes	WT	L1	L5	L81
GA2ox1	1,00 \pm 0,13	0,53 \pm 0,22	0,98 \pm 0,65	0,75 \pm 0,23
GA2ox2	1,00 \pm 0,62	0,58 \pm 0,24	0,43 \pm 0,23	1,16 \pm 0,99
GA2ox3	1,00 \pm 0,39	0,77 \pm 0,24	0,46 \pm 0,22	0,79 \pm 0,13
GA2ox4	1,00 \pm 0,19	0,14 \pm 0,10*	0,23 \pm 0,11*	0,48 \pm 0,50
GA2ox5	1,00 \pm 0,56	0,25 \pm 0,19	0,64 \pm 0,39	1,41 \pm 1,43
P+5				
Genes	WT	L1	L5	L81
GA2ox1	1,00 \pm 0,51	0,52 \pm 0,09	0,69 \pm 0,18	1,09 \pm 0,21
GA2ox2	1,00 \pm 0,29	1,13 \pm 0,38	1,02 \pm 0,20	0,77 \pm 0,12
GA2ox3	1,00 \pm 0,06	0,10 \pm 0,06*	0,10 \pm 0,02*	0,55 \pm 0,40
GA2ox4	1,00 \pm 0,20	0,39 \pm 0,15*	0,43 \pm 0,23*	0,28 \pm 0,08*
GA2ox5	1,00 \pm 0,27	1,00 \pm 0,20	0,90 \pm 0,48	0,56 \pm 0,03
P+10				
Genes	WT	L1	L5	L81
GA2ox1	1,00 \pm 0,15	0,27 \pm 0,08*	0,16 \pm 0,03*	-
GA2ox2	1,00 \pm 0,18	1,21 \pm 0,35	0,27 \pm 0,05*	-
GA2ox3	1,00 \pm 0,55	0,05 \pm 0,03*	0,18 \pm 0,05*	-
GA2ox4	1,00 \pm 0,10	0,05 \pm 0,02*	0,02 \pm 0,01*	-
GA2ox5	1,00 \pm 0,14	0,11 \pm 0,03*	0,04 \pm 0,02*	-
E+5				
Genes	WT	L1	L5	L81
GA2ox1	1,00 \pm 0,20	0,17 \pm 0,08*	0,36 \pm 0,19*	0,50 \pm 0,13*
GA2ox2	1,00 \pm 0,02	0,09 \pm 0,05*	0,10 \pm 0,06*	0,34 \pm 0,22*
GA2ox3	1,00 \pm 0,11	0,12 \pm 0,07*	4,27 \pm 1,09*	0,16 \pm 0,14*
GA2ox4	1,00 \pm 0,49	0,31 \pm 0,003*	0,21 \pm 0,04*	0,74 \pm 0,25
GA2ox5	1,00 \pm 0,38	0,59 \pm 0,19	0,35 \pm 0,09*	1,36 \pm 0,38

Tabla S3. Valores de expresión relativa del gen *SIGA2ox1* en plantas silvestres y líneas transgénicas *35S::amiRNA2ox1*. Todos los valores de expresión están referidos al valor de expresión promedio del gen *SIGA2ox1* en las plantas silvestres (WT) y son el resultado de la media de tres réplicas biológicas \pm STD.

***, significativamente diferente del silvestre ($P < 0.05$)**

Tejidos	<i>SIGA2ox1</i>			
	WT	L11	L12	L13
Plántulas	1,00 \pm 0,36	0,62 \pm 0,28	0,85 \pm 0,41	0,42 \pm 0,04*
Hojas	1,00 \pm 0,39	0,46 \pm 0,12	0,49 \pm 0,21	0,28 \pm 0,22*
D0	1,00 \pm 0,27	0,46 \pm 0,12*	0,32 \pm 0,07*	0,31 \pm 0,14*
P+10	1,00 \pm 0,20	0,31 \pm 0,10*	0,39 \pm 0,04*	0,62 \pm 0,11*
P+20	1,00 \pm 0,59	0,52 \pm 0,13	0,80 \pm 0,07	0,50 \pm 0,04

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster G. T. S, Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 19: 1188–1193.
2. Agharkar, M, Lomba, P, Altpeter, F, Zhang, H, Kenworthy, K, Lange, T. (2007) Stable expression of AtGA2ox1 in a low-input turfgrass (*Paspalum notatum* Flugge) reduces bioactive gibberellin levels and improves turf quality under field conditions. *Plant Biotechnology Journal.* 5 (6): 791-801.
3. Aguilar-Martínez, J. A, Poza-Carrión, C, Cubas, P. (2007) *Arabidopsis* BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *The Plant Cell.* 19: 458–472.
4. Alabadí, D, Agüero, M.S, Pérez-Amador, M.A, Carbonell, J. (1996) Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries (changes in unpollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin or gibberellin). *Plant Physiol.* 112(3):1237-1244.
5. Alabadí, D, Carbonell, J. (1998) Expression of ornithine decarboxylase is transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and gibberellic acid in tomato ovaries. *Plant Physiol.* 118: 323-328.
6. Allen, R. S, Millgate, A. G, Chitty, J. A, Thisleton, J, Miller, J. A. C, Fist, A. J, Gerlach, W. L, Larkin, P. J. (2004) RNAi-mediated replacement of morphine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. *Nat Biotechnol.* 22 (12): 1559-1566.
7. Alonso, J.M, Stepanova, A.N, Leisse, T.J, Kim, C.J, Chen, H, Shinn, P, Stevenson, D.K, Zimmerman, J, Barajas, P, Cheuk, R, Gadrinab, C, Heller, C, JESKE, A, Koesema, E, Meyers, C.C, Parker, H.; Prednis, L, Ansari, Y, Choy, N, Deen, H, Geralt, M, Hazari, N, Hom, E, Karnes, M, Mulholland, C, Ndubaku, R, Schmidt, I, Guzman, P, Aguilar-Henonin, L, Schmid, M, Weigel, D, Carter, D.E, Marchand, T, Risseeuw, E, Brogden, D.; Zeko, A.; Crosby, W.L.; Berry, C.C, Ecker, J.R. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 301(5633): 653-657.
8. Álvarez, J. P, Pekker, I, Goldshmidt, A, Blum, E, Amsellem, Z, Eshed, Y. (2006) Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell.* 18: 1134-1151.
9. 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.

10. Aya, K, Ueguchi-Tanaka, M, Kondo, M, Hamada, K, Yano, K, Nishimura, M, Matsuoka, M. (2009). Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of GAMYB. *Plant Cell* 21: 1453-1472.
11. Bai, M, Yang, G, Chen, W, Mao, Z, Kang, H, Chen, G, Yang, Y, Xie, B. (2012) Genome-wide identification of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families and their expression analyses in response to viral infection and abiotic stresses in *Solanum lycopersicum*. *Gene*. 501(1): 52-62.
12. Bassel, G.W, Mullen, R.T, Bewley, J. D. (2008) *procera* is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *J. Exp. Bot.* 59 (3): 585-593.
13. Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*. 431(7006):356-363.
14. Bensen, R. J, Zeevaart, J.A.D. (1990) Comparison of ent-kaurene synthase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and gib-1, gib-2, and gib-3 tomato plants. *J. Plant Growth Regul.* 9: 237-242.
15. Berger, F, Grini, P.E, Schnittger, A. (2006) Endosperm: an integrator of seed growth and development. *Curr Opin Plant Biol.* 9(6):664-670.
16. Bergounoux, V. (2013) The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnol Adv.* ISSN 0734-9750.
17. Bishop, G.J, Nomura, T, Yokota, T, Harrison, K, Noguchi, T, Fujioka, S, Takatsuto, S, Jones, J.D, Kamiya, Y. (1999) The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(4):1761-1766.
18. Bishop, G.J, Yokota, T. (2001) Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant Cell Physiol.* 42(2):114-120.
19. Blázquez, M. A, Green, R, Nilsson, O, Sussman, M. R, Weigel, D. (1998) Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell*.10: 791-800.
20. Bohner, J, Hedden, P, Bora-Haber, E, Bangerth, F. (1988) Identification and quantitation of gibberellins in fruits of *Lycopersicon esculentum*, and their relationship to fruit size in *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Physiologia Plantarum.* 73: 348–353.

21. Boss, P.K, Thomas, M.R. (2002) Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature*. 416(6883):847-850.
22. Bradley, D, Carpenter, R, Copsey, L, Vincent, C, Rothstein, S, Coen, E. S. (1996) Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature*. 379: 791-797.
23. Bradley, D, Ratcliffe, O, Vincent, C, Carpenter, R, Coen, E. (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*. 275:80-83.
24. Brukhin, V, Hernould, M, Gonzalez, N, Chevalier, C, Mouras, A. (2003) Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry. *Sex Plant Rep.* 15(6): 311-320.
25. Butardo, V. M, Fitzgerald, M. A, Bird, A. R, Gidley, M. J, Flanagan, B. M, Larroque, O, Resurrección, A. P, Laidlaw, H. K. C, Jobling, S. A, Morell, M. K, Rahman, S. (2011) Impact of down-regulation of starch branching enzyme IIb in rice by artificial microRNA and hairpin RNA-mediated RNA silencing. *J Exp Bot.* 62 (14): 4927-4941.
26. Busov, V.B, Meilan, R, Pearce, D.W, Ma, C, Rood, S.B, Strauss, S.H. (2003) Activation tagging of a dominant gibberellin catabolism gene (GA 2-oxidase) from poplar that regulates tree stature. *Plant Physiol.* 132(3):1283-1291.
27. Carmi, N, Salts, Y, Dedicova, B, Shabtai, S, Barg, R. (2003) Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary. *Planta*. 217: 726–735.
28. 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 SIDELLA 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.
29. 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.
30. Chen, F, Bradford, K.J. (2000) Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiol.* 124:1265-1274.

31. Chen, F, Nonogaki, H. and Bradford, K.J. (2002) A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. *J. Exp. Bot.* 53: 215-223.
32. Chen, K.Y, Tanksley, S.D. (2004) High-resolution mapping and functional analysis of se2.1: a major stigma exertion quantitative trait locus associated with the evolution from allogamy to autogamy in the genus *Lycopersicon*. *Genetics*. 168(3):1563-1573.
33. Chen, K.Y, Cong, B, Wing, R, Vrebalov, J, Tanksley, S.D. (2007) Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science*. 318(5850):643-645.
34. 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.
35. Cheng, H, Qin, L.J, Lee, S.C, Fu, X.D, Richards, D.E, Cao, D.N, Luo, D, Harberd, N.P, Peng, J.R. (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development*. 131: 1055–1064.
36. 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.
37. Chhun, T, Aya, K, Asano, K, Yamamoto, E, Morinaka, Y, Watanabe, M, Kitano, H, Ashikari, M, Matsuoka, M, Ueguchi-Tanaka, M. (2007). Gibberellin regulates pollen viability and pollen tube growth in rice. *The Plant Cell* 19: 3876–3888.
38. Chiang, H.H, Hwang, I, Goodman, H.M. (1995). Isolation of the *Arabidopsis* GA4 locus. *Plant Cell* 7:195–201.
39. Chu, Y, Faustinelli, P, Ramos, M. L, Hajduch, M, Stevenson, S, Thelen, J. J, Maleki, S. J, Cheng, H, Ozias-Akins P. (2008) Reduction of IgE binding and nonpromotion of *Aspergillus flavus* fungal growth by simultaneously silencing Ara h 2 and Ara h 6 in peanut. *J. Agricultural and Food Chemistry*. 56 (23): 11225-11233.
40. Claeys, H, De Bodt, S, Inzé, D. (2013) Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks. *Trends Plant Sci*. S1360-1385.
41. Cloning of artificial microRNAs. Protocol by Rebecca Schwab, MPI for Developmental Biology, Tuebingen, 2005.

42. Collett, C. E, Harberd, N. P, Leyser, O. (2000) Hormonal Interactions in the Control of Arabidopsis Hypocotyl Elongation. *Plant Physiol.* 124(2): 553–562.
43. Cong, B, Tanksley, S.D. (2006) FW2.2 and cell cycle control in developing tomato fruit: a possible example of gene co-option in the evolution of a novel organ. *Plant Mol Biol.* 62(6):867-880.
44. Cosgrove, D.J, Sovonick-Dunford, S.A. (1989) Mechanism of gibberellin-dependent stem elongation in peas. *Plant Physiol.* 89: 184–191.
45. Curtis, P.J, Cross, B.E. (1954). Gibberellic acid. A new metabolite from the culture filtrates of *Gibberella fujikuroi*. *Chem. Ind.* 1066.
46. Dhankher, O.P, Rosen, B.P, McKinney, E.C, Meagher, R.B. (2006) Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of Arabidopsis silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(14):5413-5418.
47. Davidson, S.E, Elliott, R.C, Helliwell, C.A, Poole, A.T, Reid, J.B. (2003) The pea gene NA encodes ent-kaurenoic acid oxidase. *Plant Physiol.* 131(1):335-344.
48. Davidson, S. E, Smith, J.J, Helliwell, C. A, Poole, A. T, Reid, J. B. (2004). The pea gene LH encodes ent-kaurene oxidase. *Plant Physiol.* 134(3):1123-1134.
49. Davière, J.M, Achard, P. (2013) Gibberellin signaling in plants. *Development.* 140:1147-1151.
50. Davuluri, G.R, van Tuinen, A, Fraser, P.D, Manfredonia, A, Newman, R, Burgess, D, Brummell, D.A, King, S.R, Palys, J, Uhlig, J, Bramley, P.M, Pennings, H.M, Bowler, C. (2005) Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nat Biotechnol.* 23(7):890-895.
51. de Saint Germain, A, Ligerot, Y, Dun, E. A, Pillot, J, Ross, J. J, Beveridge, C. A, Rameau, C. (2013) Strigolactones Stimulate Internode Elongation Independently of Gibberellins. *Plant Physiology.* 163: 1012–1025.
52. Dill, A, Thomas, S.G, Hu, J, Steber, C.M, Sun, T.P. (2004) The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellins induced degradation. *Plant Cell.* 16: 1392–1405.
53. Dorcey, E, Urbez, C, Blázquez, M. A, Carbonell J, Perez-Amador, M. A. (2009) Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellins metabolism in Arabidopsis. *The Plant Journal.* 58: 318–332.

54. Dumas, C, Rogowsky, P. (2008) Fertilization and early seed formation. *C R Biol.* 331(10):715-725.
55. 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.
56. Eady, C.C, Kamoi, T, Kato, M, Porter, N.G, Davis, S, Shaw, M, Kamoi, A, Imai, S. (2008) Silencing onion lachrymatory factor synthase causes a significant change in the sulfur secondary metabolite profile. *Plant Physiol.* 147(4): 2096-2106.
57. Eamens, A.L, Waterhouse, P. M. (2011) Vectors and methods for hairpin RNA and Artificial microRNA-mediated gene silencing in plants. *Methods in Molecular Biology.*701: 179-197.
58. Eamens, A. L, Agius, C, Smith, N. A, Waterhouse, P. M, Wanga, M. (2011) Efficient silencing of endogenous microRNAs using artificial microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant.* 4 (1): 157-170.
59. Ellul, P, García-Sogo, B, Pineda, B, Ríos, G, Roig, L.A, Moreno, V. (2003) The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theoretical and Applied Genetics.* 106. 231–238.
60. Eyal, E, Levy, A.A. (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Curr Opin Plant Biol.* 5: 112-117.
61. Fagoaga, C, Tadeo, F. R, Iglesias, D. J, Huerta, L, Lliso, I, Vidal, A. M, Talon, M, Navarro, L, García-Martínez, J. L, Peña, L. (2007) Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture. *J. Exp Bot.* 58 (6): 1407–1420.
62. Falara, V, Akhtar, T. A, Nguyen, T. T.H, Spyropoulou, E. A, Bleeker, P. M, Schauvinhold, I, Matsuba, Y, Bonini, M. E, Schillmiller, A. L, Last, R. L, Schuurink, R. C, Pichersky, E. (2011) The tomato terpene synthase gene family. *Plant Physiol.* 157: 770-789.
63. Fire, A, Xu, S, Montgomery, M.K, Kostas, S.A, Driver, S.E, Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391(6669): 806-811.

64. Fleishon, S, Shani, E, Ori, N, Weiss, D. (2011) Negative reciprocal interactions between gibberellin and cytokinin in tomato. *New Phytol.* 190(3):609-617.
65. Foolad, M.R. (2007) Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int J Plant Genomics.* 2007: 1-52.
66. Fos, M, Nuez, F, García-Martínez, J.L. (2000) The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiology.* 122: 471–479.
67. Fos, M, Proaño, K, Nuez, F, García-Martínez, J.L. (2001) Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiol Plant.* 111(4):545-550.
68. Frigerio, M, Alabadí, D, Pérez-Gómez, J, García-Cárcel, L, Phillips, A. L, Hedden, P, Blázquez, M. A. (2006) Transcriptional Regulation of Gibberellin Metabolism Genes by Auxin Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 142: 553-563.
69. Gallego-Giraldo, L, García-Martínez, J.L, Moritz, T, López-Díaz, I. (2007). Flowering in tobacco needs gibberellins but is not promoted by the levels of active GA₁ and GA₄ in the apical shoot. *Plant and Cell Physiology.* 48: 615–625.
70. Gallego-Giraldo, L. (2008) Efecto de la sobreexpresión y del silenciamiento de genes del metabolismo de giberelinas sobre el desarrollo de tabaco. Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Valencia-IBMCP-CSIC.
71. 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.
72. Gasser, C.S, Robinson-Beers, K. (1993) Pistil Development. *Plant Cell.* 5(10):1231-1239.
73. Gil-Humanes, J, Pistón, F, Hernando, A, Álvarez, J. B, Shewry, P. R, Barro, F. (2008) Silencing of γ -gliadins by RNA interference (RNAi) in bread wheat. *Journal of Cereal Science.* 48: 565–568.

74. Gil-Humanes, J, Pistón, F, Tollefsen, S, Sollid, L. M, Barro, F. (2010) Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *PNAS*. 107 (39): 17023-17028.
75. Gillaspay, G, Ben-David, H, Gruissem, W. (1993) Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell*. 5(10): 1439-1451.
76. Gómez, M. D, Úrbez, C, Pérez-Amador, M. A, Carbonell, J. (2011) Characterization of constricted fruit (ctf) Mutant Uncovers a Role for AtMYB117/LOF1 in Ovule and Fruit Development in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. 6(4): 18760-18769.
77. Gomi, K, Sasaki, A, Itoh, H, Ueguchi-Tanaka, M, Ashikari, M, Kitano, H, Matsuoka, M. (2004) GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J*. 37(4): 626-634.
78. Griffiths, J, Murase, K, Rieu, I, Zentella, R, Zhang, Z.L, Powers, S.J, Gong, F, Phillips, A. L, Hedden, P, Sun, T, Thomas, S. G. (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 18:3399–3414.
79. Groot, S.P.C, Karssen, C.M. (1987) Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta*. 171 (4): 525-531.
80. Groot, S.P.C, Kieliszewska-Rokicka, B, Vermeer, E, Karssen, C. M. (1988) Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta*. 174 (4): 500-504
81. Hartley, J.L, Temple, G.F, Brasch, M.A. (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res*. 10(11):1788-1795.
82. Hauvermale, A. L, Ariizumi, T, Steber, C. M. (2012) Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiol*. 160: 83-92.
83. Hazra, P, Dutta, A. K. (2010) Expression of parthenocarpy in tomato due to temperature and pollination treatment. *International Journal of Vegetable Science*. 16(3): 222 -232.
84. Hedden, P, Phillips, A. L. (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*. 5 (12): 523-530.
85. Hedden, P. (2008) Plant biology: Gibberellins close the lid. *Nature*. 456(7221):455-456.

86. Hedden, P, Thomas, S. G. (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* 444: 11-25.
87. Helliwell, C, Waterhouse, P. (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods.* 30(4):289-295.
88. Hirano, K, Asano, K, Tsuji, H, Kawamura, M, Mori, H, Kitano, H, Ueguchi Tanaka, M, Matsuoka, M. (2010). Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice. *Plant Cell.* 22: 2680–2696.
89. Ho, L.C, Hewitt, J.D. (1986). Fruit development. En: *The tomato crop. A scientific basis for improvement.* (Eds Atherton, J.G, Rudich, J,) pp 201-239. Chapman & Hall, New York.
90. Hobson, G, Davies, J. (1970). The tomato. En: *The Biochemistry of Fruits and Their Products.* (Ed Hulme, A.C.) pp 437-482, Academic Press, London.
91. Hori, S. (1898). Some observations on "Bakanae" disease of the rice plant. *Mem. Agric. Res. Sta.* (Tokyo) 12 (1): 110-119.
92. Hoekema, A, Hirsch, P. R, Hooykaas, P. J .J, Schilperoort, R. A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature.* 303: 179-180.
93. Hu, J.H, Mitchum, M.G, Barnaby, N, Ayele, B.T, Ogawa, M, Nam, E, Lai, W.C, Hanada, A, Alonso, J.M, Ecker, J.R, Swain, S.M, Yamaguchi, S, Kamiya, Y, Sun, T.P. (2008) Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 20: 320-336.
94. Huntzinger, E, Izaurralde, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.* 12(2):99-110.
95. Ikeda, A, Ueguchi-Tanaka, M, Sonoda, Y, Kitano, H, Koshioka, M, Futsuhara, Y, Matsuoka, M, Yamaguchi, J. (2001) slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell.* 13(5):999-1010.
96. Inzé, D. (2005). Green light for the cell cycle. *EMBO J.* 24: 657–662.

97. Imai, R, Yang, Y. Y, Ait-Ali, T, Kawaide, H, Kamiya, Y. (1996) Cloning and light-regulated expression of two cDNAs for *ent*-kaurene synthase A from tomato. *Plant Cell Physiol. Supplement*, 37, Abstract 539.
98. Ikeda, A, Ueguchi-Tanaka, M, Sonoda, Y, Kitano, H, Koshioka, M, Futsuhara, Y, Matsuoka, M, Yamaguchi, J. (2001) slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell*. 13(5):999-1010.
99. Izhaki A, Borochoy A, Zamski E, Weiss D. (2002). Gibberellin regulates post microsporogenesis processes in petunia anthers. *Physiologia Plantarum* 115: 442–447.
100. Jan, A, Yang, G, Nakamura, H, Ichikawa, H, Kitano, H, Matsuoka, M, Matsumoto, H, Komatsu, S. (2004) Characterization of a xyloglucan endotransglucosylase gene that is up-regulated by gibberellin in rice. *Plant Physiol*. 136: 3670–3681.
101. Jasinski, S, Tattersall, A, Piazza, P, Hay, A, Martinez-Garcia, J.F, Schmitz, G, Therese, K, McCormick, S, Tsiantis, M. (2008) PROCERA encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. *Plant J*. 56:603–612.
102. Jacobsen, S.E, Olszewski, N.E. (1991). Characterization of the arrest in anther development associated with gibberellin deficiency of the gib-1 mutant of tomato. *Plant Physiology*. 97: 409-414.
103. Jong, M, Mariani, C, Vriezen, W.H. (2009) The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *J Exp Bot*. 60(5):1523-1532.
104. Karimi, M, Inzé, D, Depicker, A. (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci*. 7(5):193-195.
105. Karimi, M, Depicker, A, Hilson, P. (2007) Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiol*. 145(4):1144-1154.
106. Kasahara, H, Hanada, A, Kuzuyama, T, Takagi, M, Kamiya, Y, Yamaguchi, S. (2002) Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in Arabidopsis. *J. Biol. Chem*. 277(47): 45188-45194.
107. Kapoor, S, Kobayashi, A, Takatsuji, H. (2002) Silencing of the tapetum-specific zinc finger gene TAZ1 causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in petunia. *Plant Cell*. 14(10):2353-2367.

108. Katoch, R, Thakur, N. (2013) Advances in RNA interference technology and its impact on nutritional improvement, disease and insect control in plants. *Appl Biochem Biotechnol.* 169(5):1579-1605.
109. Kaur, J, Sebastian, J, Siddiqi, I. (2006) The *Arabidopsis*-me2-like genes play a role in meiosis and vegetative growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18: 545-559.
110. Kelley D. R, Estelle, M. (2012) Ubiquitin-mediated control of plant hormone signaling. *Plant Physiol.* 160: 47-55.
111. Kende, H, van der Knaap, E, Cho, H.T. (1998) Deepwater rice: a model plant to study stem elongation. *Plant Physiol.* 118: 1105-1110.
112. Kerschen, A, Napoli, C.A, Jorgensen, R.A, Müller, A.E. (2004) Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. *FEBS Lett.* 566(1-3):223-228.
113. Köksal, M, Hu, H, Coates, R.M, Peters, R.J, Christianson, D.W. (2011) Structure and mechanism of the diterpene cyclase ent-copalyl diphosphate synthase. *Nat Chem Biol.* 7(7):431-433.
114. Koornneef, M, Veen, J.H. (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heyneh. *Theoretical and Applied Genetics.* 58(6): 257-263.
115. Koornneef, M, Bosma, T.D.G, Hanhart, C.J, Veen, J.H, Zeevaart, J.A.D. (1990) The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. *Theoretical and Applied Genetics.* 80 (6): 852-857.
116. Koshioka, M, Nishijima, T, Yamazaki, H, Liu, Y, Nonaka, M, Mander L.N. (1994) Analysis of gibberellins in growing fruits of *Lycopersicon esculentum* after pollination or treatment with 4-chlorophenoxyacetic acid. *J. Horticultural Science.* 69: 171–179.
117. Krysan, P.J, Young, J.C, Sussman, M.R. (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 11(12): 2283-2290.
118. Kurosawa, E. (1926) Experimental studies on the nature of the substance secreted by the “bakanae” fungus. *Nat Hist Soc Formosa.* 16: 213–227.
119. Kusaba, M, Miyahara, K, Iida, S, Fukuoka, H, Takano, T, Sassa, H, Nishimura, M, Nishio, T. (2003) Low glutelin content: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. *Plant Cell.* 15(6):1455-1467.

120. Lange, T, Kappler, J, Fischer, A, Frisse, A, Padeffke, T, Schmidtke, S, Pimenta-Lange, M. J. (2005) Gibberellin Biosynthesis in Developing Pumpkin Seedlings. *Plant Physiol.* 139 (1): 213-223.
121. Lechner, E, Achard, P, Vansiri, A, Potuschak, T, Genschik, P. (2006) F-box proteins everywhere. *Current Opinion in Plant Biology.* 9(6): 631-638.
122. Lee, S, Cheng, H, King, K.E, Wang, W, He, Y, Hussain, A. Lo, J, Harberd, N.P, Peng, J. (2002) Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* 16: 646–658.
123. Lee, Y, Kende, H. (2002) Expression of α -expansin and expansin-like genes in deepwater rice. *Plant Physiol.* 130:1396–1405.
124. Lee, D.J, Zeevaart, J.A.D. (2005). Molecular cloning of GA 2-oxidase3 from spinach and its ectopic expression in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol.* 138: 243–254.
125. Lester, D.R, Ross, J.J, Smith, J.J, Elliott, R.C, Reid, J.B. (1999) Gibberellin 2-oxidation and the SLN gene of *Pisum sativum*. *Plant J.* 19: 65–73.
126. Li, J.F, Chung, H.S, Niu, Y, Bush, J, McCormack, M, Sheen, J. (2013) Comprehensive protein-based artificial microRNA screens for effective gene silencing in plants. *Plant Cell.* 25(5):1507-1522.
127. Linkies, A, Graeber, K, Knight, C, Leubner-Metzger, G. (2010) The evolution of seeds. *New Phytol.* 186(4):817-831.
128. Liu, Q, Singh, S.P, Green, A.G. (2002) High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant Physiol.* 129(4):1732-1743.
129. Liu, C, Zhang, L, Sun, J, Luo, Y, Wang, M.B, Fan, Y.L, Wang, L. (2010) A simple artificial microRNA vector based on ath-miR169d precursor from Arabidopsis. *Mol Biol Rep.* 37(2):903-909.
130. Livak, K. J, Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* 25 (4): 402-408.
131. Lo, S, Yang, S, Chen, K, Hsing, Y, Zeevaart, J. A.D, Chen, L, Yu, S. (2008) A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. *Plant Cell.* 20(10): 2603–2618.

132. Locascio, A, Blázquez, M.A, Alabadí, D. (2013a) Genomic analysis of DELLA protein activity. *Plant Cell Physiol.* 54(8):1229-1237.
133. Locascio, A, Blázquez, M. A, Alabadí, D. (2013b) Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction. *Current Biology.* 23 (9): 804-809.
134. Lozano, R, Angosto, T, Gómez, P, Payan, C, Capel, J, Huijser, P, Salinas, J, Martínez-Zapater, J.M. (1998) Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of MADS-Box genes. *Plant Physiol.* 117(1):91-100.
135. Lozano, R, Giménez, E, Cara, B, Capel, J, Angosto, T. (2009) Genetic analysis of reproductive development in tomato. *Int J Dev Biol.* 53(8-10):1635-1648.
136. Macmillan, J, Suter, P.J. (1958). The occurrence of gibberellin A1 in higher plants: Isolation from the seed of runner bean (*Phaseolus multiflorus*). *Naturwiss* 45: 46.
137. Magome, H, Nomura, T, Hanada, A, Takeda-Kamiya, N, Ohnishi, T, Shinmad, Y, Katsumata, T, Kawaide, H, Kamiya, Y, Yamaguchi, S. (2013) CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *PNAS.* 110 (5): 1947-1952.
138. Mann, D.G, Lafayette, P.R, Abercrombie, L.L, King, Z.R, Mazarei, M, Halter, M.C, Poovaiah, C.R, Baxter, H, Shen, H, Dixon, R.A, Parrott, W.A, Neal-Stewart. C. Jr. (2012) Gateway-compatible vectors for high-throughput gene functional analysis in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and other monocot species. *Plant Biotechnology J.* 10: 226–236.
139. Mariotti, L, Picciarelli, P, Lombardi, L, Ceccarelli, N. (2011) Fruit-set and early fruit growth in tomato are associated with increases in indoleacetic acid, cytokinin, and bioactive gibberellin contents. *Journal of Plant Growth Regulation.* 30 (4): 405-415.
140. 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.
141. Martí, C, Orzáez, D, Ellul, P, Moreno, V, Carbonell, J, Granell, A. (2007) Silencing of *DELLA* induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *The Plant Journal.* 52: 865–876.

142. Martí, E, Carrera, E, Ruiz-Rivero, O, García-Martínez, J. L. (2010) Hormonal regulation of tomato gibberellin 20-oxidase1 expressed in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 167 (14): 1188-1196.
143. Martin, D.N, Proebsting, W.M, Hedden, P. (1999) The SLENDER gene of pea encodes a gibberellin 2-oxidase. *Plant Physiol* 121: 775–781.
144. Martínez-Andújar, C, Pluskota, W. E, Bassel, G. W, Asahina, M, Pupel, P, Nguyen, T.T, Takeda-Kamiya, N, Toubiana, D, Bai, B, Górecki, R. J, Fait, A, Yamaguchi, S, Nonogaki, H. (2012) Mechanisms of hormonal regulation of endosperm cap-specific gene expression in tomato seeds. *The Plant Journal.* 71(4): 575-586.
145. Martín-Trillo, M, Grandío, E. G, Serra, F, Marcel, F, Rodríguez-Buey, M. L, Schmitz, G, Theres, K, Bendahmane, A, Dopazo, H, Cubas, P. (2011) Role of tomato BRANCHED1-like genes in the control of shoot branching. *The Plant Journal.* 67: 701–714.
146. Mascarenhas, J.P. (1989) The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell.* 1(7):657-664.
147. Mauriat, M, Sandberg, L.G, Moritz, T. (2011) Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to control auxin-dependent leaf development and bud outgrowth in hybrid aspen. *The Plant Journal.* 67 (5): 805-816.
148. McGinnis, K.M, Thomas, S.G, Soule, J.D, Strader, L.C, Zale, J.M, Sun, T.P, Steber, C.M. (2003) The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell.* 15: 1120–1130.
149. Medina, M. (2010) Androesterilidad ligada a la obtención de frutos partenocárpicos en cultivares comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Valencia-IBMCP-CSIC.
150. Medina, M, Roque, E, Pineda, B, Cañas, L, Rodríguez-Concepción, M, Beltrán, J. P, Gómez-Mena, C. (2013) Early anther ablation triggers parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biotechnol. J.* 1-10.
151. Meissner, R, Jacobson, Y, Melamed, S, Levyatuv, S, Shalev, G, Ashri, A, Elkind, Y, Levy, A. (1997) A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal.* 12 (6): 1465-1472.

152. Miki, D, Itoh, R, Shimamoto, K. (2005) RNA Silencing of Single and Multiple Members in a Gene Family of Rice. *Plant Physiology*. 138: 1903–1913.
153. Molnar, A, Bassett, A, Thuenemann, E, Schwach, F, Karkare, S, Ossowski, S, Weigel, D, Baulcombe, D. (2009) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*. 58(1):165-174.
154. Muir, S.R, Collins, G.J, Robinson, S, Hughes, S, Bovy, A, Ric De Vos, C.H, van Tunen, A.J, Verhoeyen, M.E. (2001) Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nat Biotechnol*. 19(5):470-474.
155. Murase, K, Hirano, Y, Sun, T, Hakoshima, T. (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature*. 456 (7221): 459-463.
156. Murashige, T, Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473–479.
157. Mutasa-Göttgens E, Hedden, P. (2009) Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J. Exp. Bot*. 60 (7): 1979-1989.
158. Nakajima, M, Shimada, A, Takashi, Y, Kim, Y.C, Park, S.H, Ueguchi-Tanaka, M, Suzuki, H, Katoh, E, Iuchi, S, Kobayashi, M, Maeda, T, Matsuoka, M, Yamaguchi, I. (2006) Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J*. 46: 880–889.
159. Napoli, C, Lemieux, C, Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*. 2(4): 279-289.
160. Nester, J.E, Zeevaart, J.A.D. (1988). Flower development in normal tomato and a gibberellin-deficient (*ga-2*) mutant. *American Journal of Botany* 75: 45–55.
161. Niu, Q.W, Lin, S.S, Reyes, J. L, Chen, K. C, Wu, H.W, Yeh, S.D, Chua, N.H. (2006) Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotech*. 24(11): 1420-1428.
162. Niu, S, Li, Z, Yuan, H, P, Fang, Chen, X, Li, W. (2013) Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to regulate adventitious root development in tobacco *J. Exp. Bot*. 64 (11): 3411-3424.

163. Nomura, T, Magome, H, Hanada, A, Takeda-Kamiya, N, Mander, L. N, Kamiya, Y, Yamaguchi, S. (2013) Functional analysis of Arabidopsis CYP714A1 and CYP714A2 reveals that they are distinct gibberellin modification enzymes. *Plant Cell Physiol.* 54 (11): 1837-1851.
164. Nonogaki, H, Gee, O.H. and Bradford, K.J. (2000) A germination-specific endo-b-mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiol.* 123: 1235–1246.
165. Nuez, F, Costa, J, Cuartero, J. (1986) Genetics of the parthenocarpy for tomato varieties “Sub-Artic Plenty,” “75/59” and “Severianín.” *Z Pflanzenzucht.* 96: 200–206.
166. Nuez, F. (2001) El cultivo del tomate. Mundi-Prensa, Madrid/Barcelona/México.
167. Ogita, S, Uefuji, H, Morimoto, M, Sano, H. (2004) Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Mol Biol.* 54(6):931-941.
168. Olimpieri, I, Siligato, F, Caccia, R, Mariotti, L, Ceccarelli, N, Soressi, G.P, Mazzucato, A. (2007) Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele is mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis *Planta.* 226: 877-888.
169. Olimpieri, I, Caccia, R, Picarella, M. E, Pucci, A, Santangelo, E, Soressi, G.P, Mazzucato, A. (2011) Constitutive co-suppression of the GA 20-oxidase1 gene in tomato leads to severe defects in vegetative and reproductive development. *Plant Science.* 180(3):496-503.
170. Ossowski, S, Schwab, R, Weigel, D. (2008) Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. 53 (4): 674-690.
171. Ozga, J. A, Reinecke, D. M, Ayele, B. T, Ngo, P, Nadeau, C, Wickramarathna, A. D. (2009) Developmental and hormonal regulation of gibberellin biosynthesis and catabolism in pea fruit. *Plant Physiol.* 150: 448-462.
172. Pabón-Mora, N, Litt, A. (2011) Comparative anatomical and developmental analysis of dry and fleshy fruits of Solanaceae. *Am. J. Bot.* 98:1415–1436.
173. Parizotto, E.A, Dunoyer, P, Rahm, N, Himber, C, Voinnet, O. (2004) In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev.* 18(18):2237-2242.

174. Park, J, Nguyen, K.T, Park, E, Jeon, J.S, Choi, G. (2013) DELLA proteins and their interacting RING finger proteins repress gibberellin responses by binding to the promoters of a subset of gibberellin-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 927–943.
175. Peng, J, Carol, P, Richards, D.E, King, K.E, Cowling, R.J, Murphy, G.P, Devos, K. M, Flintham, J. E, Beales, James, Fish, L. J, Worland, A. J, Pelica, F, Sudhakar, D, Christou, P, Snape, J. W, Gale, M. D, Harberd, N. P. (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* 11: 3194–3205.
176. Pharis, R.P, King, R.W. (1985). Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 517-568.
177. Philouze, J, Maisonneuve, B. (1978) Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the soviet variety Severianin. *Tomato Genet Coop.* 28: 12–13.
178. Philouze, J. (1983) Parthénocarpiе naturelle chez le tomate. I. Revue bibliographique. *Agronomie.* 3 (7): 611-620.
179. Phinney, B.O, West, C.A, Ritzel, M.B, Neely, P.M. (1957). Evidence for gibberellin-like substances from flowering plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)* 43: 398-404.
180. Pistón, F, Uauy, C, Fu, L, Langston, J, Labavitch, J, Dubcovsky, J. (2010) Down-regulation of four putative arabinoxylan feruloyl transferase genes from family PF02458 reduces ester-linked ferulate content in rice cell walls. *Planta.* 231 (3): 677-691.
181. Plackett, A.R, Thomas, S.G, Wilson, Z.A, Hedden, P. (2011) Gibberellin control of stamen development: a fertile field. *Trends Plant Sci.* 16: 568–578.
182. Pnueli, L, Carmel-Goren, L, Hareven, D, Gutfinger, T, Alvarez, J, Ganai, M, Zamir, D, Lifschitz, E. (1998) The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development.* 125(11):1979-1989.
183. Poethig, R. S. (2003) Phase change and the regulation of developmental timing in plants. *Science.* 301 (5631): 334-336.
184. Poulsen, C, Vaucheret, H, Brodersen, P. (2013) Lessons on RNA silencing mechanisms in plants from eukaryotic argonaute structures. *Plant Cell.* 25(1):22-37.

185. Rademacher, W. (2000) Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 51:501-531.
186. Radley, M. (1956). Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. *Nature.* 178: 1070-1071.
187. Ranjan, A, Ichihashi, Y, Sinha N. R. (2012) The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. *Genome Biology.* 13:167-174.
188. Rebers, M, Kaneta, T, Kawaide, H, Yamaguchi, S, Yang, Y.Y, Imai, R, Sekimoto, H, Kamiya, Y. (1999) Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *The Plant Journal.* 17(3): 241-250.
189. Reiser, L, Fischer, R.L. (1993) The ovule and the embryo Sac. *Plant Cell.* 5(10):1291-1301.
190. Ribeiro, D.M, Araújo, W.L, Fernie, A.R, Schippers, J.H, Mueller-Roeber, B. (2012) Translatome and metabolome effects triggered by gibberellins during rosette growth in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 63: 2769–2786.
191. Rieu, I, Eriksson, S, Powers, S. J, Gong, F, Griffiths, J, Woolley, L, Benlloch, R, Nilsson, O, Thomas, S. G, Hedden, P, Phillips, A. L. (2008) Genetic Analysis Reveals That C₁₉-GA 2-Oxidation Is a Major Gibberellin Inactivation Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell.* 20: 2420–2436.
192. Rueda-Romero, P, Barrero-Sicilia, C, Gómez-Cadenas, A, Carbonero, P, Oñate-Sánchez, L. (2012) Arabidopsis thaliana DOF6 negatively affects germination in non-after-ripened seeds and interacts with TCP14. *J Exp Bot.* 63(5): 1937-1949.
193. Sakamoto, T, Kobayashi, M, Itoh, H, Tagiri, A, Kayano, T, Tanaka, H, Iwahori, S, Matsuoka, M. (2001) Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice. *Plant Physiol.* 125: 1508-1516.
194. Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama, K, Kobayashi, M, Agrawal, G. K, Takeda, S, Abe, K, Miyao, A, Hirochika, H, Kitano, H, Ashikari, M, Matsuoka, M. (2004). An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol.* 134:1642–1653.
195. Sallaud, C, Meynard, D, van Boxtel, J, Gay, C, Bes, M, Brizard, J.P, Larmande, P, Ortega, D, Raynal, M, Portefaix, M, Ouwerkerk, P.B, Rueb, S, Delseny, M, Guiderdoni,

- E. (2003) Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor Appl Genet.* 106:1396-1408.
196. Sánchez-Fernández, R, Ardiles-Díaz, W, Van Montagu, M, Inzé, D, May, M. J. (1998) Cloning of a novel *Arabidopsis thaliana* RGA-like gene, a putative member of the VHIID-domain transcription factor family. *J. Exp. Bot.* 49 (326): 1609-1610.
197. Sato, S, Peet, M. M, Gardner, R. G. (2004) Altered flower retention and developmental patterns in nine tomato cultivars under elevated temperature. *Scientia Horticulturae.* 101: 95–101.
198. Sauter, M, Mekhedov, S.L, Kende, H. (1995) Gibberellin promotes histone H1 kinase activity and the expression of *cdc2* and cyclin genes during the induction of rapid growth in deepwater rice internodes. *Plant J.* 7(4):623-63.
199. Schmitz, G, Theres, K. (1999) Genetic control of branching in *Arabidopsis* and tomato. *Curr Opin Plant Biol.* 2(1):51-55.
200. Schomburg, F.M, Bizzell, C.M, Lee, D.J, Zeevaart, J.A.D, Amasino, R.M. (2003). Overexpression of a novel class of gibberellins 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* 15: 151–163.
201. Schwab, R, Ossowski, S, Riester, M, Warthmann, N, Weigel, D. (2006) Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18: 1121-1133.
202. Schwab, R, Voinnet, O. (2009) miRNA processing turned upside down. *EMBO J.* 28: 3633-3634.
203. Scott, J.W, Harbaugh, B. K. (1989) Micro-Tom: a miniature dwarf tomato. *Florida Agr Exp Sta Cir.* 370:1-6.
204. Serrani, J.C, Sanjuán, R, Ruiz-Rivero, O, Fos, M, García-Martínez J. L. (2007a) Gibberellin Regulation of Fruit Set and Growth in Tomato. *Plant Physiol.* 145: 246-257.
205. Serrani, J.C, Fos, M, Atarés, A, García-Martínez, J. L. (2007b) Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv Micro-Tom of tomato. *J Plant Growth Reg.* 26: 211–221.
206. Serrani, J.C. (2008) Interacción de Giberelinas y Auxinas en la Fructificación del Tomate. Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Valencia-IBMCP-CSIC.

207. Serrani, J.C, Ruiz-Rivero, O, Fos, M, García-Martínez, J. L. (2008) Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant Journal* 56: 922–934.
208. Seymour, G. B, Ostergaard, L, Chapman, N. H, Knapp, S, Martin C. (2013) Fruit development and ripening. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:219–241.
209. Shi, R, Yang, C, Lu, S, Sederro, R, Chiang, V. L. (2011) Specific down-regulation of *PAL* genes by artificial microRNAs in *Populus trichocarpa*. *Planta*. 232:1281-1288.
210. Shigemitsu, T, Ozaki, S, Saito, Y, Kuroda, M, Morita, S, Satoh. S, Masumura, T. (2012) Production of human growth hormone in transgenic rice seeds: co-introduction of RNA interference cassette for suppressing the gene expression of endogenous storage proteins. *Plant Cell Rep.* 31: 539–549.
211. Shimada, A, Ueguchi-Tanaka, M, Nakatsu, T, Nakajima, M, Naoe, Y, Ohmiya, H, Kato, H, Matsuoka, M. (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor *GID1*. *Nature*. 456 (7221): 520-523.
212. Silverstone, A.L, Ciampaglio, C.N, Sun, T. (1998) The Arabidopsis *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellins signal transduction pathway. *Plant Cell* 10: 155–169.
213. Singh, D. P, Jermakow, A.M, Swain, S.M. (2002). Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in Arabidopsis. *Plant Cell*. 14: 3133–3147.
214. Smith, N.A, Singh, S.P, Wang, M.B, Stoutjesdijk, P.A, Green, A.G, Waterhouse, P.M. (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*. 407(6802):319-320.
215. Song, J.J, Smith, S. K, Hannon, G. J, Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. 305 (5689): 1434-1437.
216. Song, S, Qi, T, Huang, H, Xie, D. (2013) Regulation of stamen development by coordinated actions of jasmonate, auxin and gibberellin in Arabidopsis. *Mol. Plant*. 6(4):1065-1073.
217. Speulman, E, Metz, P.L, van Arkel, G, Hekkert, B. L, Stiekema, W. J, Pereira, A. (1999) A two-component enhancer-inhibitor transposon mutagenesis system for functional analysis of the Arabidopsis genome. *Plant Cell*. 11(10): 1853-1866.

218. Stodola, F.H, Raper, K.B, Fennell, D.I, Conway, H.F, Johns, V.E, Langford, C.T, Jackson, R.W. (1955). The microbial production of gibberellins A and X. *Arch. Biochem. Biophys.* 54: 240-245.
219. Strader, L.C, Ritchie, S, Soule, J.D, McGinnis, K.M, Steber, C.M. (2004) Recessive interfering mutations in the gibberellin signaling gene SLEEPY1 are rescued by overexpression of its homologue, SNEEZY. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 12771–12776.
220. Sun, T.P, Kamiya, Y. (1994) The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase entkaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell.* 6(10):1509-1518.
221. Swain, S.M, Muller, A.J, and Singh, D.P. (2004). The gar2 and rga alleles increase the growth of gibberellin-deficient pollen tubes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134: 694-705.
222. Takahashi, N, Kitamura, H, Kawarada, A, Seta, Y, Takai, M, Tamura, S, Sumiki, Y. (1955) Isolation of gibberellins and their properties. *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan.* 19: 267-277.
223. Takahashi, N, Seta, Y, Kitamura, H, Sumiki, Y. (1957) A new gibberellin, gibberellin A₄ and their properties. *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan.* 21: 396-398.
224. Talón, M. (2000) Giberelinas. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal.* Azcón-Bieto, J y Talón, M. Ed. Interamericana McGraw Hill. Ed. U. de Barcelona. Pp 325-341.
225. Tamura, S. (1991). Historical aspects of gibberellins. En: *Gibberellins* (Eds Takahashi, N, Phinney, B.O. y Macmillan, J.) pp 1-8. Springer-Verlag New York.
226. Thomas, S. G, Phillips, A. L, Hedden, P. (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *PNAS.* 96 (8): 4698-4703.
227. Thomas, S.G, Rieu, I, Steber, C.M. (2005) Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam Horm.* 72:289-338.
228. Thouet, J, Quinet, M, Ormenese, S, Kinet, J.M, Périlleux, C. (2008) Revisiting the involvement of SELF-PRUNING in the sympodial growth of tomato. *Plant Physiol.* 148(1):61-64.
229. Toppino, L, Kooiker, M, Lindner, M, Dreni, L, Rotino G. L, Kater, M. M. (2011) Reversible male sterility in eggplant (*Solanum melongena* L.) by artificial microRNA-

- mediated silencing of general transcription factor genes. *Plant Biotechnology Journal*. 9: 684-692.
230. Travella, S, Klimm, T. E, y Keller, B. (2006) RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat. *Plant Physiol*. 142: 6-20.
231. Trigueros, M, Navarrete-Gómez, M, Sato, S, Christensen, S. K, Pelaz, S, Weigel, D, Yanofsky, M. F, Ferrándiz, C. (2009) The *NGATHA* genes direct style development in the *Arabidopsis* gynoecium. *Plant Cell*. 21: 1394-1409.
232. Úbeda-Tomás, S, García-Martínez, J. L, López-Díaz, I. (2006) Molecular, biochemical and physiological characterization of gibberellin biosynthesis and catabolism genes from *Nerium oleander*. *J. Plant Growth Regulation*. 25(1): 52-68.
233. Úbeda-Tomás, S, Federici, F, Casimiro, I, Beemster, G.T.S, Bhalerao, R, Swarup, R, Doerner, P, Haseloff, J, Bennett, M. J. (2009) Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Current Biology*. 19(14):1194-1199.
234. Ueguchi-Tanaka, M, Ashikari, M, Nakajima, M, Itoh, H, Katoh, E, Kobayashi, M, Chow, T.Y, Hsing, Y.I, Kitano, H, Yamaguchi, I, Matsuoka, M. (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*. 437(7059): 693-698.
235. Varbanova, M, Yamaguchi, S, Yang, Y, McKelvey, K, Hanada, A, Borochoy, R, Yu, F, Jikumaru, Y, Ross, J, Cortes, D, Ma, C.J, Noel, J.P, Mander, L, Shulaev, V, Kamiya, Y, Rodermel, S, Weiss, D, Pichersky, E. (2007) Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell*. 19(1):32-45.
236. Vardy, E, Lapushner, D, Genizi, A, Hewitt, J. (1989) Genetics of parthenocarpy in tomato under a low temperature regime: II. *Cultivar Severianin Euphytica*. 41: 9-15.
237. Varga, A, Bruinsma, J. (1986). Tomato. En: *CRC Handbook of Fruit Set and Development* (Ed Monselise, S.P.) pp 461-480. CRC Press, Boca Raton FL.
238. Vinoth, S, Gurusaravanan, P, Jayabalan, N. (2013) Optimization of factors influencing microinjection method for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tomato. *Appl Biochem Biotechnol*. 169(4):1173-1187.

239. Wang, H, Caruso, L.V, Downie, A.B, Perry, S.E. (2004) The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *Plant Cell*. 16: 1206–1219.
240. Wang, Y, Deng, D. (2013) Molecular basis and evolutionary pattern of GA–GID1–DELLA regulatory module. *Mol Genet Genomics*. 10: 1-9.
241. Wang, X, Han, F, Yang, M, Yang, P, Shen, S. (2013a) Exploring the response of rice (*Oryza sativa*) leaf to gibberellins: a proteomic strategy. *Rice*. 6(1): 17.
242. Wang, L, Zheng, J, Luo, Y, Xu, T, Zhang, Q, Zhang, L, Xu, M, Wan, J, Wang, M, Zhang, C, Fan, Y. (2013b) Construction of a genomewide RNAi mutant library in rice. *Plant Biotechnol J*. 11 (8): 997-1005.
243. Wang, F, Deng, X. W. (2011) Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Cell Res*. 21(9): 1286-1294.
244. Warthmann, N, Chen, H, Ossowski, S, Weigel, D, Hervé, P. (2008) Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PLoS ONE*. 3(3): 1829-1838.
245. Waterhouse, P.M, Helliwell, C.A. (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet*. 4(1):29-38.
246. Wesley, S.V, Helliwell, C, Wang, M.B, Waterhouse, P. (2004) Posttranscriptional gene silencing in plants. *Methods Mol Biol*. 265:117-129.
247. West, C. A, Phinney, B. O. (1959) Gibberellins from flowering plants. I. Isolation and properties of a gibberellin from *Phaseolus vulgaris* L. *J. Am. Chem. Soc*. 81 (10): 2424-2427.
248. Wen, C.K, Chang, C. (2002) Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell*. 14: 87–100.
249. Weiss, D, Van Der Luit A, Knegt, E, Vermeer, E, Mol, J.N.M, Kooter, J.M. (1995) Identification of endogenous gibberellins in petunia flower, induction of anthocyanin biosynthetic gene expression and the antagonistic effect of abscisic acid. *Plant Physiol* 107: 695–702.
250. Willige, B. C, Ghosh, S, Nill, C, Zourelidou, M, Dohmann, E. M, Maier, A, Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellins receptor of Arabidopsis. *Plant Cell*. 19: 1209-1220.

251. Xian, Z, Yang, Y, Huang, W, Tang, N, Wang X, Li, Z. (2013) Molecular cloning and characterisation of SIAGO family in tomato. *BMC Plant Biology*. 13:126-138.
252. Wollenweber, H.W. (1931) Fusarium-Monographie. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 3 (3): 269-516.
253. Wollenweber, H. W, Reinking, O. A. (1935) Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. pp 1-355; Paul Parey, Berlin
254. Xing, S, Qin, G, Shi, Y, Ma, Z, Chen, Z, Gu, H, Qu, L. (2007) GAMT2 encodes a methyltransferase of gibberellic acid that is involved in seed maturation and germination in Arabidopsis. *J. Integr Plant Biol*. 49 (3): 368-381.
255. Xu, Y.L, Li, L, Wu, K, Peeters, A.J, Gage, D.A, Zeevaart, J.A. (1995) The GA5 locus of Arabidopsis thaliana encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(14): 6640-6644.
256. Xu, P, Zhang, Y, Kang, L, Roossinck, M.J, Mysore, KS. (2006) Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiol*. 142(2): 429-440.
257. Yabuta, T, Sumiki, Y. (1938). On the crystal of gibberellin, a substance to promote plant growth. *J Agric Chem Soc Japan*. 14: 1526.
258. Yadegari, R, Drews, G.N. (2004) Female gametophyte development. *Plant Cell*. 16 Suppl:S133-141.
259. Yamaguchi, S, Smith, M.W, Brown, R.G, Kamiya, Y, Sun, T. (1998). Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β -hydroxylase genes in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell*. 10:2115–2126.
260. Yamaguchi, S, Kamiya, Y. (2000) Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol*. 41(3):251-257.
261. Yamaguchi, S. (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*. 59: 225-251.
262. Yan, P, Shen, W, Gao, X, Li, X, Zhou, P, Duan, J. (2012) High-throughput construction of intron-containing hairpin RNA vectors for RNAi in plants. *PLoS ONE*. 7(5): 38186.
263. Yang, Y.Y, Rebers, M, Toyomasu, T, Kawaide, H, Kaneta, T, Kamiya, Y. (1998) Cloning of two cDNAs encoding gibberellin 3 beta-hydroxylase (Accession no.

- AB010991, AB010992) of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings (PGR8-200). *Plant Physiol.* 118:1534.
264. Yaxley, J. R, Ross, J. J, Sherriff, L. J, Reid, J. B. (2001) Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. *Plant Physiol.* 125(2): 627–633.
265. Zeng, Y, Wagner, E. J, Cullen, B. R. (2002) Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell.* 9(6):1327-1333.
266. Zhou, J, Yu, F, Chen, B, Wang, X, Yang, Y, Cheng, Y, Yan, C, Chen, J. (2013) Universal vectors for constructing artificial microRNAs in plants. *Biotechnology Letters.* 35(7): 1127-1133.
267. Zhu, Y, Nomura, T, Xu, Y, Zhang, Y, Peng, Y, Mao, B, Hanada, A, Zhou, H, Wang, R, Li, P, Zhu, X, Mander, L. N, Kamiya, Y, Yamaguchi, S, He, Z. (2006) ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell.* 18: 442-456.