

2016



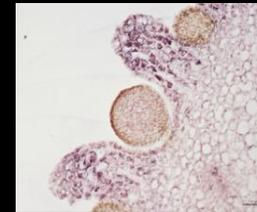
UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Tesis Doctoral

Programa de doctorado en Biotecnología

Papel de la GA-20oxidasas en la fructificación del tomate



Miriam Gallego García

Tesis Doctoral
Miriam Gallego García
Director: Dr. José Luis García Martínez
Valencia, 2016



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

Papel de la GA 20-oxidasa en la fructificación del tomate

Presentada por:

Miriam Gallego García

Para optar al título de DOCTOR

Por la Universidad Politécnica de Valencia

Director:

José Luis García Martínez

Valencia, Enero 2016

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de Control Hormonal de la Fructificación dirigido por el Dr. José Luis García Martínez, dentro del programa de Doctorado de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia y gracias a una beca FPI del Ministerio de Economía y Competitividad.

La colección de mutantes de MT cuasi-isogénicos usada en el trabajo fue cedida por el Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, Profesor Asistente de Fisiología Vegetal de la Universidad de São Paulo (Brasil), a quién expreso por ello mi profundo agradecimiento.

Agradezco al Dr. Peter Hedden, Rothamsted Research de Harpenden (Inglaterra), su colaboración para la construcción del transgen *pSIGA20ox1::GUS*.

Deseo agradecer también al Prof. Thomas J. Guilfoyle, University of Missouri (USA), la cesión de la construcción *DR5::GUS* para obtener la correspondiente línea transgénica en MT.

Los resultados de hibridación *in situ* y de inmunolocalización de IAA fueron posibles gracias a la ayuda de la Dra. Serena Varotto de la Universidad de Padua (Italia), que me acogió para aprender ambas técnicas en su laboratorio, donde llevé a cabo también parte de los experimentos descritos en este trabajo.

Gracias José Luis, por tu confianza depositada en mí para llevar a cabo el proyecto, pero sobre todo por tu apoyo y comprensión durante todo este tiempo.

La estancia en el IBMCP me ha brindado la oportunidad de conocer a tanta gente que sería imposible nombrar y, que de una forma u otra, forman parte de esos momentos especiales de la tesis. Los buenos para poder compartirlos y recordarlos con cariño, y los malos que me han hecho crecer. Gracias a todos.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, que no necesito nombrar porque, tanto ellas como yo, sabemos que desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

A mi familia, mi marido Roberto, mi hermana Raquel y a mis adorados padres.

Gracias a todos.

Índice

Índice

Resúmenes	VII
Resumen-----	VII
Abstract-----	VIII
Resum-----	IX
Introducción	3
1. El tomate-----	1
1.1. Nomenclatura y taxonomía	1
1.2. Origen, domesticación y expansión	1
1.3. Características generales de la planta de tomate.....	2
1.4. Desarrollo vegetativo.....	3
1.4.1. Modelo de crecimiento	3
1.4.2. Hojas	3
1.5. Desarrollo reproductivo	5
1.5.1. Morfología floral.....	5
1.5.2. Inflorescencias	7
1.6. Fructificación y desarrollo del fruto.....	8
1.6.1. Polinización y fecundación	8
1.6.2. Desarrollo del fruto de tomate.....	9
1.7. Estructura del fruto de tomate	10
1.8. Genes que controlan el tamaño y forma del fruto	11
2. Giberelinas-----	12
2.1. Estructura química	12
2.2. Biosíntesis	13
2.2.1. Síntesis de <i>ent</i> -kaureno a partir de geranilgeranildifosfato (GGDP)	13
2.2.2. Conversión de <i>ent</i> -kaureno en GA ₁₂	13
2.2.3. Síntesis de GAs de 19 y 20 carbonos a partir de GA ₁₂	13
2.3. Actividad biológica	15
2.4. Genes implicados en el metabolismo de las GAs.....	15
2.4.1. Genes del metabolismo de GAs en tomate	16
2.5. Regulación de la ruta biosintética.....	18
2.5.1. Regulación homeostática	18
2.5.2. Regulación por otras hormonas	18
2.6. Mecanismo de señalización por GAs	19
3. Auxinas-----	21
3.1. Estructura química	21
3.2. Biosíntesis de IAA.....	21
3.3. Mecanismo de señalización por auxinas.....	22
4. Brasinosteroides-----	23
4.1. Estructura química	23
4.2. Biosíntesis	24

5.	Regulación hormonal del desarrollo del fruto en tomate-----	25
5.1.	Giberelinas y fructificación	25
5.2.	Auxinas y fructificación	26
5.3.	Brasinosteroides y fructificación	27
6.	El cultivar Micro-Tom -----	27
	Material y Métodos.....	29
1.	Material vegetal-----	31
2.	Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas y mutantes -----	32
3.	Análisis estadístico-----	33
4.	Cultivo de las plantas-----	34
5.	Tratamientos hormonales -----	34
6.	Fertilización cruzada -----	34
7.	Soluciones y medios de cultivo -----	35
7.1.	Cultivo <i>in vitro</i> de plantas	35
7.2.	Medios de cultivo bacteriológicos	35
7.3.	Antibióticos	36
8.	Métodos de biología molecular -----	36
9.	Preparación de la construcción <i>pSIGA20ox1::GUS</i> -----	38
10.	Transformación genética de tomate -----	38
10.1.	Obtención de explantes de hoja	39
10.2.	Preparación del cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para la transformación	39
10.3.	Cocultivo e inducción de caulogénesis.....	39
10.4.	Enraizamiento de los ápices producidos y aclimatación	39
10.5.	Evaluación del nivel de ploidía	40
10.6.	Selección de transformantes por kanamicina.....	40
11.	Hibridación <i>in situ</i> -----	40
11.1.	Obtención de las sondas	40
11.2.	Transcripción <i>in vitro</i> de la sonda	41
11.3.	Fijación del material	41
11.4.	Deshidratación del material	41
11.5.	Inclusión del material en parafina.....	41
11.6.	Corte histológico de las muestras	42
11.7.	Desparafinado de los portaobjetos.....	42
11.8.	Hibridación de la sonda.....	42
11.9.	Lavados posthibridación y detección inmunológica de la señal	42
12.	Análisis de actividad GUS -----	43
12.1.	Actividad GUS en cortes histológicos	43
12.2.	Actividad GUS en plántulas	44
13.	Inmunolocalización de IAA-----	44

13.1. Procesado de las muestras	44
Objetivos	47
Resultados I	51
Caracterización fenotípica de MT y sus mutantes-----	51
1. Caracterización vegetativa. -----	54
1.1. Altura	55
1.2. Morfología de la hoja.....	55
1.3. Número de hojas.....	56
1.4. Diámetro del entrenudo	57
1.5. Efecto de los transgenes <i>pSIGA20ox1::GUS</i> y <i>DR5::GUS</i> sobre el fenotipo vegetativo de las líneas mutantes	57
2. Caracterización reproductiva-----	57
2.1. Número de flores en la inflorescencia terminal	58
2.2. Tiempo de floración.....	59
2.3. Área de los sépalos	61
2.4. Área de los pétalos.....	61
2.5. Longitud del cono estaminal.....	61
2.6. Longitud pistilo	62
2.7. Número de pétalos	62
2.8. Efecto de los transgenes <i>pSIGA20ox1::GUS</i> y <i>DR5::GUS</i> sobre el fenotipo reproductivo de las líneas mutantes	65
2.9. Porcentaje de partenocarpia	67
2.9.1. Ensayo de partenocarpia en plantas con flores no manipuladas (partenocarpia natural).....	68
2.9.2. Ensayo de partenocarpia en plantas con flores emasculadas (partenocarpia inducida)	68
3. Fenotipo de ramificación -----	69
3.1. Tasa de ramificación	71
3.2. Ramificación por posición de la yema axilar	71
3.3. Efecto de los transgenes <i>pSIGA20ox1::GUS</i> y <i>DR5::GUS</i> sobre la ramificación de las líneas mutantes	74
3.4. Longitud final de los brotes laterales.....	74
3.5. Efecto de los transgenes <i>pSIGA20ox1::GUS</i> y <i>DR5::GUS</i> sobre la longitud de los brotes axilares de las líneas mutantes.....	75
Resultados II	77
Localización de la expresión de <i>SIGA20ox1</i> en ovarios durante la fructificación -----	77
II.A.- Análisis de la expresión de <i>SIGA20ox1</i> en ovario mediante el gen delator <i>GUS</i> -----	79
1. Introducción -----	79
2. Expresión de <i>pSIGA20ox1::GUS</i> en MT-----	79
3. Expresión de <i>pSIGA20ox1::GUS</i> en la línea <i>35S::CcGA20ox1</i> -----	82

4. Expresión de <i>pSIGA20ox1::GUS</i> en la línea <i>procera</i> -----	84
5. Expresión de <i>pSIGA20ox1::GUS</i> en la línea <i>Dwarf</i> -----	86
6. Expresión de <i>pSIGA20ox1::GUS</i> en el híbrido <i>Dwarf/35S::CcGA20ox1</i> -----	89
7. Expresión de <i>pSIGA20ox1::GUS</i> en la línea <i>dgt</i> -----	92
8. Expresión de <i>pSIGA20ox1::GUS</i> en la línea <i>entire</i> -----	94
II. B: Análisis de la expresión de <i>SIGA20ox1</i> mediante hibridación <i>in situ</i> . -----	96
1. Introducción-----	96
2. Diseño de las sondas mediante análisis <i>in silico</i> -----	96
3. Selección de la sonda a utilizar -----	98
4. Localización de transcritos en ovarios tras polinización-----	99
5. Localización en ovarios no polinizados tratados con auxina -----	100
Resultados III	101
Localización espacial y temporal de auxinas en el ovario durante la fructificación -----	101
III.A.- Análisis de la expresión de <i>DR5</i> en ovario mediante el gen delator <i>GUS</i> -----	103
1. Introducción-----	103
2. Expresión de <i>DR5</i> en MT -----	103
3. Expresión de <i>DR5</i> en la línea <i>Dwarf</i> -----	106
4. Expresión de <i>DR5</i> en la línea <i>entire</i> -----	108
III.B. Análisis del contenido de IAA en el ovario mediante inmunolocalización -----	111
Discusión	113
Fenotipo de Micro-Tom (MT) y mutantes hormonales-----	115
Regulación hormonal de la ramificación -----	117
Expresión de <i>pSIGA20ox1</i> durante la fructificación utilizando <i>GUS</i> como gen delator -----	118
Expresión de <i>SIGA20ox1</i> durante la fructificación mediante hibridación <i>in situ</i> -----	120
Localización de IAA durante la fructificación utilizando la expresión de <i>DR5</i> -----	121
Inmunolocalización de IAA en el ovario durante la fructificación-----	122
Modelo propuesto de la regulación de la transcripción del gen <i>SIGA20ox1</i> durante la fructificación y localización espacial de GAs e IAA -----	124
Conclusiones	127
Bibliografía	131

Resúmenes

Resumen

La fructificación, paso del ovario en reposo a fruto en crecimiento tras la polinización, asociada al aumento de contenido de giberelinas (GAs) y auxinas en el ovario, es un proceso clave para la producción. Por ello se puede inducir también el desarrollo de frutos partenocárpicos (sin semillas) aplicando ambos tipos de hormonas. En tomate se ha descrito que parte de la acción de las auxinas en la fructificación está mediada por GAs, induciendo distintos genes de la ruta biosintética, entre ellos los que codifican *SIGA20ox*, enzimas importantes para la regulación de la síntesis de GAs. De los 4 genes que forman la familia, *SIGA20ox1* parece ser clave en la fructificación. Con objeto de profundizar en el conocimiento de este proceso, se ha investigado en el ovario de tomate: a) la localización de la expresión de *SIGA20ox1* y su regulación; b) la localización de IAA (auxina).

Para ello, se han obtenido líneas transgénicas del cultivar Micro-Tom (MT) de tomate y diversos mutantes hormonales (*procera*, *35S::CcGA20ox1 Dwarf*, *dgt* y *entire*) con el transgén *pSIGA20ox1::GUS*. Las líneas transgénicas no difieren fenotípicamente de las líneas originales y se utilizaron para analizar la expresión de *SIGA20ox1* con el gen delator *GUS*. Se investigó además la localización de los transcritos de *SIGA20ox1 in situ*. La expresión de *SIGA20ox1* en el ovario tras la polinización se localizó, principalmente, en el funículo, la placenta y el embrión. Tanto las auxinas como los brasinosteroides (BR) aumentaron la expresión de *SIGA20ox1*.

Por otro lado se investigó la localización de auxinas en el ovario usando una línea transgénica *DR5::GUS* (que expresa el gen de respuesta a auxinas *DR5*), y analizando también directamente el contenido de IAA mediante inmunolocalización. En ovarios polinizados, la localización de las GAs y auxinas coincidió en el óvulo (embrión y saco embrionario) y la placenta, apoyando la hipótesis de que ambas hormonas interactúan durante la fructificación.

El análisis fenotípico de los mutantes utilizados mostró que las GAs inhiben el desarrollo de los brotes axilares por GAs, a través de la proteína DELLA. El efecto inhibitorio es revertido, al menos parcialmente, por BR. Por otro lado, la introducción del gen silvestre *Dwarf* en MT (normalizando así su contenido en BR) aumenta la altura de la planta, pero no prolonga su ciclo vegetativo, ni aumenta la capacidad partenocárpica de MT.

Abstract

Fruit set is the transition from a quiescent ovary of the flower to a developing fruit after pollination. This process is associated with the content of gibberellin (GAs) and auxins in the ovary. Therefore the development of parthenocarpic fruit (seedless fruit) can be induced by applying both kinds of hormones. In tomato it has been described that auxin action during fruit set is mediated by GAs, by inducing different biosynthesis pathway genes, among them *SIGA20ox*, which codify important enzymes for GAs biosynthesis regulation. The *SIGA20ox* gene family is composed of 4 genes, and *SIGA20ox1* seems to play a key role in fruit set. In order to deepen the understanding of this process, it has been investigated in the ovary of tomato: a) the site of expression of *SIGA20ox1* and its regulation; b) the localization of IAA (auxin).

For this, we have obtained transgenic lines of the tomato Micro-Tom (MT) cultivar and various hormonal mutants (*procera*, *35S::CcGA20ox1 Dwarf*, *entire* and *dgt*) with the transgene *pSIGA20ox1::GUS*. Transgenic lines do not differ phenotypically from the original lines and they have been used to analyze the expression of *SIGA20ox1*, using the *GUS* gene as reporter. Localization of *SIGA20ox1* transcripts was also investigated *in situ*. *SIGA20ox1* expression in ovary after pollination was located mainly in the funiculus, placenta and embryo. Auxin and brassinosteroids (BR) increased the expression of *SIGA20ox1*.

On the other hand, auxin location in the ovary was investigated using the transgenic line *DR5::GUS* (expressing the auxin-response gene *DR5*), and analyzing directly the IAA content by immunolocalization. In pollinated ovaries, GAs and auxin co-localize in the egg (embryo and embryo-sac) and placenta, supporting the hypothesis that both hormones interact during fruit set.

Phenotypic analysis of the mutants used in this work showed that GAs inhibit the development of axillary buds, through the DELLA protein. This inhibitory effect is reversed, at least partially, by BR. Furthermore, the introduction of wild gen *Dwarf* in MT (normalizing its content of BR) increases plant height, but does not extend its vegetative cycle, nor increases parthenocarpy in MT.

Resum

La fructificació, pas de l'ovari en repòs a fruit en creixement després de la pol·linització, associada a l'augment de contingut de giberelines (GAs) i auxines en l'ovari, és un procés clau per a la producció. Per això es pot induir també el desenvolupament de fruits partenocàrpics (sense llavors) aplicant tots dos tipus d'hormones. En el tomàquet s'ha descrit que part de l'acció de les auxines en la fructificació està intervinguda per GAs, induint diferents gens de la ruta biosintètica, entre ells els que codifiquen *SIGA20ox*, enzims importants per a la regulació de la síntesi de GAs. Dels 4 gens que formen la família, *SIGA20ox1* sembla ser clau en la fructificació. A fi d'aprofundir en el coneixement d'aquest procés, s'ha investigat en l'ovari del tomàquet: a) la localització de l'expressió de *SIGA20ox1* i la seva regulació; b) la localització de l'IAA (auxina).

Per a això, s'han obtingut línies transgèniques de conrear Micro-Tom (MT) de tomàquet i diversos mutants hormonals (*procera*, *35S::CcGA20ox1 Dwarf*, *dgt* i *entire*) amb el transgèn *pSIGA20ox1::GUS*. Les línies transgèniques no difereixen fenotípicament de les línies originals i es van utilitzar per analitzar l'expressió de *SIGA20ox1* amb el gen delator *GUS*. Es va investigar, a més, la localització dels transcrits de *SIGA20ox1 in situ*. L'expressió de *SIGA20ox1* en l'ovari després de la pol·linització es va localitzar, principalment, en el funicle, la placenta i l'embrió. Tant les auxines com els brasinosteroides (BR) van augmentar l'expressió de *SIGA20ox1*.

D'altra banda es va investigar la localització d'auxines en l'ovari usant una línia transgènica *DR5::GUS* (que expressa el gen de resposta a auxines *DR5*) i analitzant també directament el contingut de IAA mitjançant immunolocalització. En ovaris polinitzats, la localització de les GAs i auxines va coincidir en l'òvul (embrió i sac embrionari) i la placenta, refermant la hipòtesi que ambdues hormones interaccionen durant la fructificació.

L'anàlisi fenotípic dels mutants utilitzats va mostrar que les GAs inhibeixen el desenvolupament dels brots axil·lars per GAs, a través de la proteïna DELLA. L'efecte inhibitor és revertit, almenys parcialment, per BR. D'altra banda, la introducció del gen silvestre *Dwarf* en MT (normalitzant així el seu contingut de BR) augmenta l'alçada de la planta, però no perllonga el seu cicle vegetatiu, ni augmenta la capacitat partenocàrpica d'MT.

Introducción

1. El tomate

El tomate es una planta herbácea, cultivada como anual y apreciada por sus frutos.

1.1. Nomenclatura y taxonomía

El nombre de “tomate” deriva de la palabra “*tomatl*” de la lengua Nahuatl del imperio Azteca. Los italianos lo llamaron “*pomi d’oro*”, pudiéndose referir a que las primeras variedades llegadas a Italia fueran amarillas. Este nombre pudo alterarse en el tiempo a “*pomi d’amori*”, que se extendió en Francia como “*pomme d’amour*” y a Gran Bretaña como “*love apple*”, atribuyéndole características afrodisiacas.

Con la creación de jardines botánicos en Europa a partir del siglo XVI, los herboristas de la época comenzaron a clasificar los especímenes almacenados en base a características medicinales o morfológicas (Fig. 1). En 1694, Joseph Pitton de Tournefort (1656-1708) dio a los tomates cultivados el nombre de *Lycopersicon*, “melocotón del lobo” en griego, debido a su parecido a la belladona, la cual, según el antiguo folclore alemán, las brujas las usaban para evocar a los hombres lobo. En el siglo XVIII, Carl Linnaeus (1707-1778) estableció la nomenclatura binomial para las especies e incluyó *Lycopersicum* dentro del género *Solanum*. Posteriormente, en 1768, Philip Miller (1691-1771) cambió el nombre a *Lycopersicon esculentum* (literalmente “melocotón del lobo comestible”), diferenciándolo del género *Solanum* e indicando su posible consumo. En la actualidad, estudios basados en marcadores genéticos moleculares han demostrado que el tomate pertenece al género *Solanum*, denominándolo *Solanum lycopersicum* L. La taxonomía actual para el tomate es:

Reino: <i>Plantae</i>	División: <i>Magnoliophyta</i>	Clase: <i>Magnoliopsida</i>
Subclase: <i>Asteridae</i>	Orden: <i>Solanales</i>	Familia: <i>Solanaceae</i>
Género: <i>Solanum</i>	Especie: <i>Solanum lycopersicum</i>	

1.2. Origen, domesticación y expansión

El tomate es originario de la costa oeste de Sudamérica, en la zona que actualmente conocemos como Perú. Se asume que su cultivo comenzó en la misma zona, sin embargo se han encontrado semillas en distintos yacimientos arqueológicos precolombinos desde Perú hasta México. El cultivo podría haberse originado en Perú, con una posterior dispersión y domesticación en México, o haberse dado eventos de domesticación en paralelo.

El tomate fue traído a Europa desde México en 1540 por los españoles como una especie de berenjena. Debido al parecido con la belladona (*Atropa belladonna* L.), los europeos no aceptaron inicialmente su consumo y se difundió como planta ornamental para los jardines. En el siglo XVI, los españoles y los italianos introdujeron el fruto de tomate en la dieta, sin embargo en el resto de Europa no se introdujo hasta el siglo XVIII.



Fig. 1: Especímenes de plantas de tomate en herbarios.

A) Espécimen de tomate del herbario Clifford en el Museo de Historia Natural de Londres (*Solanum lycopersicum* L.). B) Ilustración realizada por Matthäus Merian en 1646. C) Ilustración del libro “A curious herbal” de Elizabeth Blackwell (1737).

Los españoles y portugueses llevaron su cultivo hasta Filipinas y al este de Malasia hacia 1650. Posiblemente desde aquí se extendió a países como China y Japón. El cultivo en África se extendió por la cuenca mediterránea desde el siglo XVI y más tardíamente a las colonias europeas del continente. Los españoles introdujeron el cultivo en Sudamérica en el siglo XVI, mientras que en América del Norte llegó a manos de los colonos europeos en el siglo XVIII, aunque no fueron bien aceptados. Se sabe que Thomas Jefferson fue pionero en el cultivo de tomates gracias a su libro “*Notes on the State of Virginia*” (1781), donde relata la economía y los recursos naturales de Virginia. El consumo de tomates se inició en Luisiana en 1812 y se extendió a los estados del noroeste hacia 1835, aunque su consumo no se popularizó en Estados Unidos hasta el siglo XX.

1.3. Características generales de la planta de tomate

La planta de tomate es una planta perenne de porte arbustivo cultivada como planta anual. El tallo es delgado y de naturaleza semileñosa, desarrollándose de forma rastrera, semierecta o erecta según la variedad. La superficie del tallo es angulosa, provista de pelos agudos y glándulas que desprenden un líquido de aroma muy característico. El patrón de crecimiento puede ser determinado o indeterminado. Las variedades con crecimiento determinado son más bajas y de producción precoz. Las variedades con crecimiento indeterminado presentan una gran longitud, ya que el crecimiento vegetativo es continuo y producen un gran número de brotes axilares y flores.

Las hojas son compuestas, imparapinnadas con una filotaxia de 2/5 y, al igual que el tallo, provistas de glándulas. Las inflorescencias son de tipo racimo con flores perfectas cuya fórmula floral es $K(5) [C(5) A(5)] G(2)$. El fruto es una baya polisperma de color y forma variables según la variedad. Todos ellos presentan una piel, pulpa firme, tejido placentario y una pulpa gelatinosa que envuelve a las semillas, las cuales son ovaladas y aplastadas, de 3 a 5 mm de longitud.

La raíz principal es pivotante y puede alcanzar hasta los 60 cm de profundidad. La producción de raíces adventicias y ramificaciones le permite adaptarse a climas secos. Sin embargo, las plantas trasplantadas sufren un cambio en el desarrollo del sistema radicular al desaparecer la raíz pivotante y presentan un mayor desarrollo horizontal de las raíces.

1.4. Desarrollo vegetativo

1.4.1. Modelo de crecimiento

El modelo de crecimiento de la plantas está definido por el patrón de alternancia y disposición de las estructuras vegetativas y reproductivas a lo largo del eje de la planta, clasificándolas en monopodiales o simpodiales.

Las plantas monopodiales, como *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, presentan un ciclo con diferenciación clara entre la fase vegetativa y reproductiva. Sin embargo, las plantas con crecimiento simpodial alternan fases vegetativas y reproductivas con regularidad.

El tomate presenta crecimiento simpodial, donde el meristemo apical del tallo (MAT) termina con una inflorescencia tras la producción de 6-12 hojas. El tallo generado a partir del MAT se denomina segmento inicial o tallo principal. A partir del meristemo simpodial (MS), localizado en la axila de la hoja terminal, se genera un nuevo brote que desplaza la inflorescencia terminal lateralmente por debajo de la hoja terminal. La estructura desarrollada a partir del MS, compuesta por tres hojas y una inflorescencia terminal, se denomina unidad simpodial (US) y el crecimiento en longitud de la planta se basa en la repetición reiterada de éstas unidades (Fig. 2A) (Jiang et al. 2013).

El crecimiento simpodial puede ser indeterminado o determinado. En el primer caso, las US se van repitiendo con la apariencia de un tallo lineal alternando las inflorescencias cada tres hojas, como ocurre en las variedades MoneyMaker, p73 y Ailsa Craig. En el crecimiento simpodial determinado, las US son progresivamente más cortas hasta que se producen dos inflorescencias consecutivas (Fig. 2). Este cambio en la arquitectura de la planta se debe a una mutación recesiva del gen *SELF-PRUNING* (*SP*) (Pnueli et al. 1998; Jiang et al. 2013). *SP* mantendría el crecimiento vegetativo en cada US, funcionando como un antagonista a la floración. *SP* es ortólogo de *CENTRORADIALIS* (*CEN*) en *Antirrhinum majus* y de *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*) en *Arabidopsis*, y ambos mantienen la indeterminación del SAM en las plantas con crecimiento monopodial (Bradley et al. 1996; Bradley et al. 1997), afectando a la arquitectura de la inflorescencia y produciendo una flor apical terminal. Algunas de las variedades de tomate que presentan crecimiento determinado son Micro-Tom, UC-82 y Rutgers (Pnueli et al. 1998; Martí et al. 2006).

1.4.2. Hojas

Las hojas se componen de un limbo o lámina, generalmente de color verde, de un peciolo que la une al tallo, y de una vaina, zona ancha de inserción al tallo. La clasificación de las hojas atiende a las características de los tres componentes de las mismas.

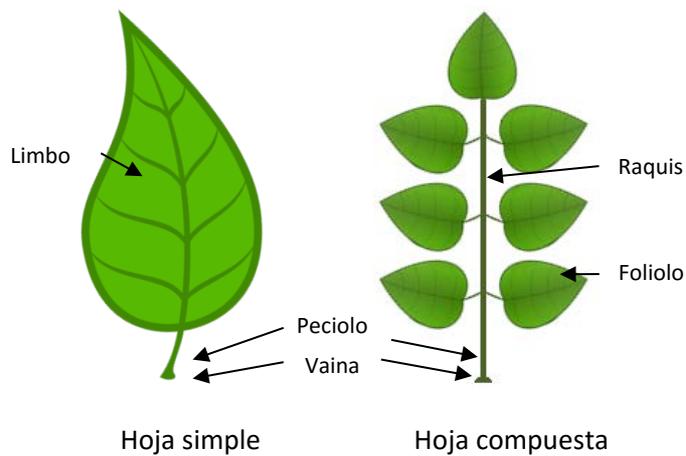
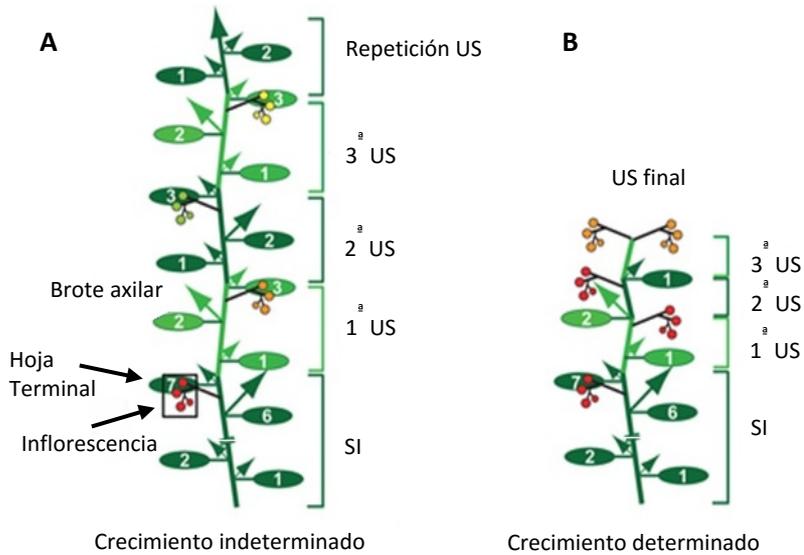


Fig. 3: Representación de hojas simples y compuestas y sus partes.

La hoja simple está compuesta por un limbo continuo mientras que en la hoja compuesta el limbo se divide en folíolos

El tomate presenta hojas pecioladas y compuestas, donde la lámina foliar se divide en subunidades llamadas folíolos, que se articulan sobre el raquis. El número de folíolos varía según la variedad de tomate, presentando en todos los casos un foliolo al final del raquis, denominándose hojas imparipinnadas. La disposición de las hojas en el tallo es helicoidal con un ángulo de divergencia de 144° , es decir, presenta filotaxis 2/5. Los

folíolos presentan los bordes dentados y nervadura reticular, con haz verde y envés grisáceo (Fig. 3).

1.5. Desarrollo reproductivo

1.5.1. Morfología floral

Las angiospermas se distinguen de las gimnospermas, fundamentalmente, por la aparición en ellas de un recipiente constituido por las hojas carpelares (el ovario) en cuyo interior se encuentran protegidos los primordios seminales. Tras la fecundación, los primordios seminales se transforman en semillas y el ovario da lugar al fruto. Es frecuente que los órganos reproductores estén protegidos por piezas foliares que constituyen la envoltura floral o perianto. Esta estructura, junto a los órganos reproductores, forman la flor, que frecuentemente es hermafrodita y puede aparecer aislada o agruparse con otras flores formando inflorescencias.

La morfología floral se representa mediante un diagrama floral y/o una fórmula floral. El diagrama floral consiste en una representación gráfica de los elementos que forman una flor sobre un plano, mediante la proyección ortogonal de cortes transversales de los verticilos. En la fórmula floral se emplean símbolos, iniciales y cifras para representar las piezas y características florales.

La fórmula floral para tomate es $* \Theta K(5) [C(5) A(5)] G(\underline{2})$, ya que es una flor regular, cíclica, gamosépala, gamostémona, gamopétala, con corola y el androceo fusionados (petalostémona), y presenta un gineceo súpero. Con todo esto, el diagrama floral del tomate está representado en la Fig. 4.

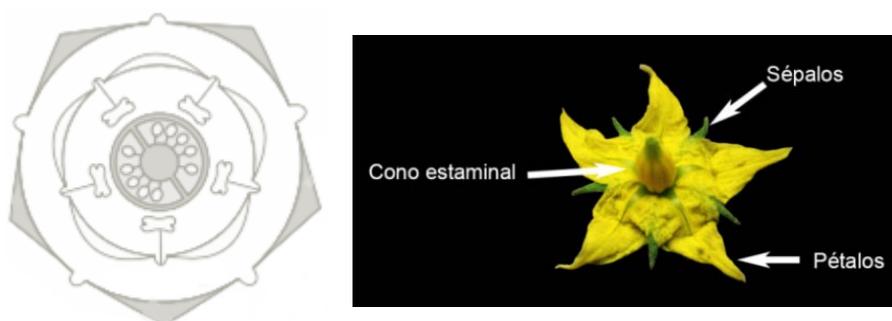


Fig. 4: Diagrama floral de *Solanum lycopersicum* y fotografía de una flor de tomate.
Diagrama: fuente <http://www.studyrankers.com>. Fotografía: fuente propia.

1.5.1.1. Androceo y gametogénesis

El androceo es el conjunto de estambres de la flor, los cuales están formados por un filamento y una antera, que se divide en dos tecas con dos sacos polínicos en cada una. En el tomate, y especies silvestres relacionadas, el extremo de las anteras se mantiene unido formando un cono estaminal característico en forma de botella y presentan dehiscencia longitudinal (Nuez 1995).

En cada antera se produce la diferenciación de células subepidérmicas en arquesporas. Éstas sufren una división tangencial originando una célula parietal y una célula esporógena, que por meiosis, genera una tétrada de microsporas haploides. Posteriormente, la microspora uninucleada se divide asimétricamente formándose dos células; la célula vegetativa y la célula generativa, de menor tamaño. La célula generativa se vuelve a dividir formando dos células espermáticas que se encuentran en el interior de la célula vegetativa. En el momento de la dehiscencia de la antera, el gametofito masculino está formado por la célula vegetativa y las dos células espermáticas, sin embargo en otros casos, el gametofito masculino es bicelular y la segunda mitosis se produce en el tubo polínico, como ocurre en tomate.

1.5.1.2. Gineceo y gametogénesis

El gineceo es el conjunto de carpelos de la flor que recibe el nombre de pistilo. El carpelo se divide en tres partes; el ovario en la parte inferior, generalmente engrosada que contiene los primordios seminales; el estigma en la parte superior, receptora del polen; y el estilo, que conecta el ovario con el estigma.

La flor puede presentar un carpelo (flor unicarperlar) o varios, que pueden estar separados (gineceo apocárptico) o fusionados total o parcialmente (gineceos sincárpicos). El ovario común de los carpelos fusionados está compartimentado en dos o más lóculos o cavidades cuyo número está relacionado con el número de carpelos. En el tomate, tanto los carpelos como los estilos están fusionados.

En el interior de los carpelos está la placenta, a la cual se unen los primordios seminales mediante el funículo. Los haces vasculares, que nutren a los primordios seminales, penetran por el funículo y terminan en la calaza. Los primordios seminales constan de uno o dos tegumentos externos que recubren la nucela (megaspogangio), los cuales presentan un orificio abierto, el micrópilo, por el que penetra el tubo polínico hacia la nucela, en cuyo interior se formará el saco embrional. En el tomate los primordios seminales se sitúan sobre una columna central de tejido dentro de un ovario compartimentado en tanto lóculos como carpelos fusionados (placentación axial).

La gametogénesis se inicia cuando una célula de la nucela se diferencia y mediante meiosis forma cuatro megasporas haploides, que generalmente forman una tétrada alineada. En la mayoría de los casos, tres de las cuatro megásporas degeneran y sólo sobrevive una que originará el gametofito femenino. La megáspora funcional se desarrolla y se divide tres veces consecutivas, originando ocho núcleos dentro de la misma célula. Los núcleos se disponen en dos grupos, uno cerca del extremo micropilar del gametofito en formación, y el otro en el extremo opuesto, cerca de la calaza. Posteriormente, un núcleo de cada grupo migra hacia el centro, formando los llamados núcleos polares. Los tres núcleos del extremo micropilar se recubren de una fina membrana, proporcionándoles de citoplasma propio, y se organizan formando una ovocélula (gameto femenino) y dos células sinérgidas. Los tres núcleos del extremo calazal también se rodean de plasma propio mediante una pared celular rígida, formándose las células antípodas. La

estructura resultante es un conjunto de siete células y ocho núcleos que conforma el gameto femenino maduro o saco embrional.

1.5.1.3. Longitud estilo

Para que ocurra la autopolinización en tomate, el estilo debe situarse a la altura del cono estaminal o por debajo de él. Las especies silvestres de tomate son alógamas y presentan estilos exertos, mientras que las variedades cultivadas de *Solanum Lycopersicum* son autógamas y presentan estilos poco exertos, a nivel del cono estaminal e incluso insertos (Fig. 5) (Chen & Tanksley 2004). La longitud del estilo está determinada genéticamente, principalmente por el QTL *stigma exertion2.1 (se2.1)* (Chen & Tanksley 2004). Dentro de éste QTL, el gen *style2.1* es el que más cambios produce en la longitud del estilo, mediante la elongación celular durante el desarrollo del estilo (Chen et al. 2007). El cambio morfológico del estilo se debe a dos deleciones en el promotor de 450 pb y de 750 pb, ya que la proteína es igual en las variedad de estilo exerto e inserto (Chen et al. 2007).

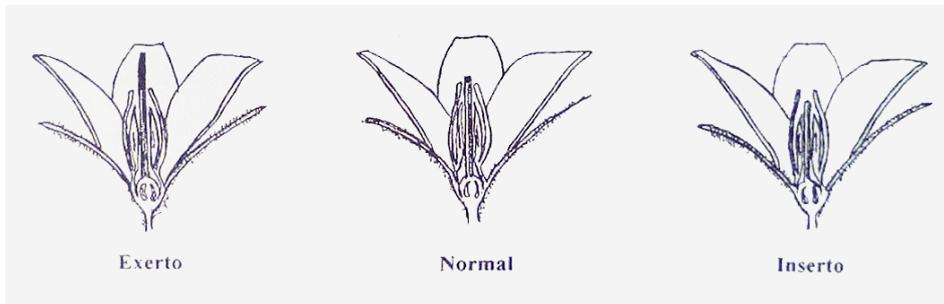


Fig. 5: Esquema de flores con estilos de distinta longitud (Chamarro 1995).

Los mutantes *procera* y *35S::CcGA20ox1* presentan flores con el estilo exerto (Carrera et al. 2012; García-Hurtado et al. 2012), lo que indica un posible papel de las GAs en la morfología floral.

La longitud del estilo también está afectada por condiciones ambientales como la iluminación deficiente y alta temperatura, que pueden provocar la exorción del estigma y un desarrollo deficiente del endotelio (Chamarro 1995).

1.5.2. Inflorescencias

Existen dos grandes grupos de inflorescencias: simples, las cuales presentan ramificaciones de primer orden; y compuestas, donde el eje principal y los laterales portan a su vez inflorescencias. Además se distinguen inflorescencias cimosas o determinadas e inflorescencias racemosas o indeterminadas. En las cimosas el eje principal de la inflorescencia produce una flor, al igual que los ejes secundarios, mientras que en las inflorescencias racemosas el eje principal, en teoría, no termina en una flor y tiene un crecimiento indefinido.

Las inflorescencias de tomate son racemosas, ya que presentan un eje principal con flores solitarias dispuestas de forma alterna o helicoidal sobre un pedúnculo que tienen aproximadamente la misma longitud, donde las flores más jóvenes están más próximas al ápice del eje (crecimiento monopódico).

1.6. Fructificación y desarrollo del fruto

La generación de nuevos especímenes, mediante las semillas, y la dispersión de los mismos por medio de los frutos es el objetivo de la fructificación, que consta de tres etapas principales; la polinización, la fertilización y la formación del fruto (Gillaspy et al. 1993).

1.6.1. Polinización y fecundación

La polinización es el transporte del polen producido por los estambres de una flor al estigma de los carpelos, mediante la dehiscencia de las anteras. Se diferencian dos modelos de polinización: la autopolinización (autogamia); el estigma es polinizado por el polen de la misma flor; y la polinización cruzada (alogamia); el estigma es polinizado por el polen producido en otra flor. La polinización se ve afectada por condiciones ambientales, como humedad y temperatura.

El grano de polen se deposita sobre el estigma cuya superficie está constituida por un tejido glandular (tejido estigmático), que facilita la adhesión y posterior hidratación de los granos de polen. La hidratación del grano de polen provoca que parte de la célula vegetativa salga por los poros, produciéndose la germinación del polen (Picken 1984). Esta prolongación citoplasmática es denominada tubo polínico, cuyo crecimiento puede durar horas o días. Durante el crecimiento del tubo polínico las células espermáticas pierden el citoplasma y los núcleos espermáticos se desplazan con el tubo polínico hacia la parte apical, hasta alcanzar el primordio seminal, al que accede por el micrópilo (porogamia o acrogamia). El tubo polínico, tras penetrar por el micrópilo, atraviesa la nucela y llega al saco embrional. El tubo polínico avanza entre las dos células sinérgidas y el núcleo vegetativo del tubo polínico degenera. Después, el tubo polínico perfora una de las células sinérgidas y se abre en su interior, vertiendo los dos núcleos espermáticos en su interior. Posteriormente, gracias a una segunda abertura en la base de la célula sinérgida, los dos núcleos espermáticos alcanzan el saco embrional. En este punto, uno de los núcleos espermáticos penetra en la ovocélula y se fusionan los núcleos, formando un cigoto diploide; mientras que el otro se fusiona con los núcleos polares (ambos haploides), formando un núcleo triploide.

La flor de tomate es autógena y el estigma es receptivo al polen desde dos días antes de la antesis. Las condiciones óptimas para la polinización pasan por una humedad relativa entre el 60% y 80% y una temperatura entre 17°C y 24°C (Brukhin et al. 2003; Fos et al. 2001).

1.6.2. Desarrollo del fruto de tomate

Los frutos son órganos encargados de albergar las semillas hasta su madurez y contribuyen a dispersarlas, bien porque disponen de mecanismos que favorecen la diseminación, o bien porque se desprenden junto con ellas de la planta madre.

Tras la fecundación, el desarrollo del fruto de tomate se puede dividir en dos fases; en la primera el crecimiento del fruto es debido principalmente a divisiones celulares, y la segunda fase se caracteriza por la expansión celular hasta que se alcanza el tamaño de fruto maduro. Posteriormente se produciría la maduración y la senescencia (Gillaspy et al. 1993; Ho & Hewitt 1986).

En la fase I, tras la fertilización, se activa la división celular en el ovario durante los 7-10 primeros días. Las células en división son pequeñas, altamente comprimidas, ricas en sustancias citoplasmáticas y con vacuolas pequeñas (Gillaspy et al. 1993). En la etapa inicial de la fase I (hasta el día 4 o 6 post anthesis), se observa que la división celular es mayor en la capa externa del pericarpo que en la capa interna; en las semillas en desarrollo, las divisiones son más numerosas en los tegumentos que en el embrión; y que las células de la columela y la placenta también presentan una alta actividad mitótica. Tras esta fase inicial, la actividad mitótica en el pericarpo sigue siendo mayor en la capa externa, y en la placenta está localizada en las capas celulares de la periferia de la semilla. Los tejidos vasculares y las semillas en desarrollo también muestran actividad mitótica. Al final de la fase I, y solapándose con la fase II, la actividad mitótica se restringe a la capa externa del pericarpo y a la capa externa de la placenta, de las cuales derivan las células locales. El tejido vascular continúa mostrando actividad mitótica, y se incrementa en el embrión en desarrollo (Suzuka et al. 1989; Daidoji et al. 1992).

El peso y tamaño final del fruto están influidos por el número de células preexistentes en el ovario y el número de fertilizaciones exitosas, ya que existe una correlación positiva entre el número de semillas en desarrollo y el mantenimiento del crecimiento del fruto. El número de óvulos fertilizados determina la tasa inicial del crecimiento del ovario y las semillas en desarrollo controlan la tasa y mantenimiento de la división celular en el fruto (Gustafson 1939; Hobson & Davies 1970; Nitsch 1970; Varga & Bruinsma 1986; Bohner & Bangerth 1988).

En tomate, la actividad mitótica en el pericarpo, después de la fertilización, provoca la proliferación de células en el exocarpo, mesocarpo y endocarpo y la diferenciación de un grupo de células del mesocarpo en células vasculares. La activación de la mitosis en las células periféricas de la placenta, causada por el embrión en desarrollo, da lugar a las células locales. Estas células son morfológicamente distintas a las células de la placenta, aunque existe un gradiente de diferenciación desde las células de la columela hasta las células locales adyacentes al pericarpo (Suzuka et al. 1989; Daidoji et al. 1992). La proliferación celular y la diferenciación de los tejidos del fruto están coordinadas temporalmente con la actividad mitótica y en el embrión en desarrollo.

La fase II, tras el periodo de división celular, el crecimiento del fruto es debido principalmente a la expansión (Coombe 1976). En el caso del tomate, el volumen de las células de la placenta, del tejido locular y del mesocarpo puede incrementarse más de 10 veces, pero las células del exocarpo y endocarpo, las cuales continúan en división, se expanden menos (Gillaspy et al. 1993). En la expansión celular, la pared celular primaria y la capa citoplasmática se vuelven relativamente más delgadas, las vacuolas ocupan una mayor proporción del volumen celular y comienza a acumularse almidón, ácidos orgánicos y otras sustancias (Chamarro 1995).

Posterior a la fase II y tras la maduración de la semilla, se produce la maduración del fruto. En este proceso se producen grandes cambios en la pigmentación, textura y contenido de metabolitos, que determinan el aroma, color, textura y composición bioquímica final del fruto (Gillaspy et al. 1993; Giovannoni 2004).

1.7. Estructura del fruto de tomate

El fruto de tomate es una baya cuyo tamaño y forma varían en función de la variedad y de las condiciones de desarrollo (Chamarro 1995). Su estructura está compuesta por diferentes tejidos y consiste en un pericarpo, formado a partir de la pared del ovario, rodeando la placenta, el tejido locular y las semillas. El pericarpo se subdivide en tres estructuras: exocarpo, mesocarpo, y endocarpo. El exocarpo consiste en una capa de cutícula y en la epidermis, la cual incluye varias capas de células colenquimáticas subepidérmicas (Lemaire-Chamley et al. 2005). El mesocarpo, la capa intermedia y más gruesa, está formado por grandes células parenquimáticas altamente vacuoladas y contiene los haces vasculares. El endocarpo, estructura más interna, consiste en una única capa celular adyacente a la región locular. Finalmente, las cavidades loculares están separadas por los septos, que confluyen en la zona interior del fruto llamada columela. Ambas estructuras son parte del pericarpo y están compuestas por células parenquimáticas (Gillaspy et al. 1993).

Las cavidades loculares se encuentran rellenas de una masa gelatinosa (tejido locular), constituido por células parenquimatosas derivadas de la placenta durante el desarrollo del fruto. Embebidas en el tejido locular se encuentran las semillas, que se componen del embrión, el endospermo y la testa que suele ser un tejido duro y piloso, siendo esta la capa más externa de la semilla y derivada a partir de los tegumentos del primordio seminal (Chamarro 1995).

En el fruto existen dos sistemas vasculares, uno que se extiende desde el pedicelo por los septos del pericarpo y el otro que va a las semillas a través de las paredes radiales y la columela. El sistema vascular se compone principalmente de tubos de floema y vasos de xilema con presencia de traqueidas.

1.8. Genes que controlan el tamaño y forma del fruto

La domesticación del tomate provocó la selección basada en el aspecto y calidad, incrementó el tamaño del fruto y aparecieron múltiples formas y colores (Paran & Van Der Knaap 2007). Las variedades del tomate se clasifican según su morfología en base a la clasificación de la Unión Internacional para la protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV; www.upon.int) (Fig. 6) (Rodríguez et al. 2011).

En tomate, se han identificado 7 QTL que intervienen en el peso del fruto que explican más del 20% de la variación del peso (Tanksley 2004). El QTL *fw2.2* fue el primero relacionado con el tamaño del fruto de tomate y puede hacer variar el tamaño del fruto en un 30% entre las variedades silvestres y domesticadas de tomate (Alpert et al. 1995; Alpert & Tanksley 1996; Frary et al. 2000). El segundo QTL más importante implicado en el tamaño y peso del fruto es *fw3.2*, que codifica una enzima P450 identificada como KLUH, la cual incrementa el número de células del pericarpo y septos, pudiendo afectar el la división celular (Anastasiou et al. 2007; Chakrabarti et al. 2013). Otro QTL importante es *fw11.3* y está implicado en el peso del fruto (Van Der Knaap & Tanksley 2003).

La forma del fruto de tomate está controlada por cuatro genes, *OVATE*, *SUN*, *FASCIATED (FAS)* Y *LOCULE NUMBER (LC)* (Rodríguez et al. 2011). *OVATE* es un controlador negativo de la elongación del fruto, mientras que *SUN* lo es positivo. *FAS* y *LC* controlan el número de lóculos del fruto y, por tanto, influyen en la forma y tamaño del fruto.

La mutación *ovate* provoca la producción de frutos ovalados, con forma de pera o de corazón (Rodríguez et al. 2011). En *Arabidopsis* las proteínas similares a *OVATE* actúan como represores transcripcionales de *AtGA20ox1*, reduciendo la elongación celular (Hackbusch et al. 2005; Wang et al. 2007; Wang et al. 2011).

La mutación *sun* causa un fenotipo de frutos alargados. La sobreexpresión de *SUN* provoca el incremento del número de células en la dirección longitudinal y el número reducido de células en la dirección trasversal del fruto, generando frutos muy alargados y partenocárpicos, parecidos a los frutos inducidos tras la aplicación de auxinas (Wu et al. 2011).

La forma y el tamaño del fruto de tomate también dependen del número de lóculos del fruto, que está determinado por el número de carpelos fusionados en la flor. Las variedades silvestres presentan entre 2 y 4 lóculos, mientras que las variedades domesticadas pueden presentar más de 15 lóculos por fruto. *FAS* codifica una proteína de la familia YABBY que regula la polaridad de los órganos e incrementa el número de lóculos de dos a más de siete, mientras que *lc* tiene un efecto más débil en el número de lóculos que en el peso del fruto (Lippman & Tanksley 2001; Cong et al. 2008). *FAS* y *LC* controlan el tamaño del meristemos floral y en consecuencia el número de carpelos fusionados (Cong et al. 2008; Muños et al. 2011).

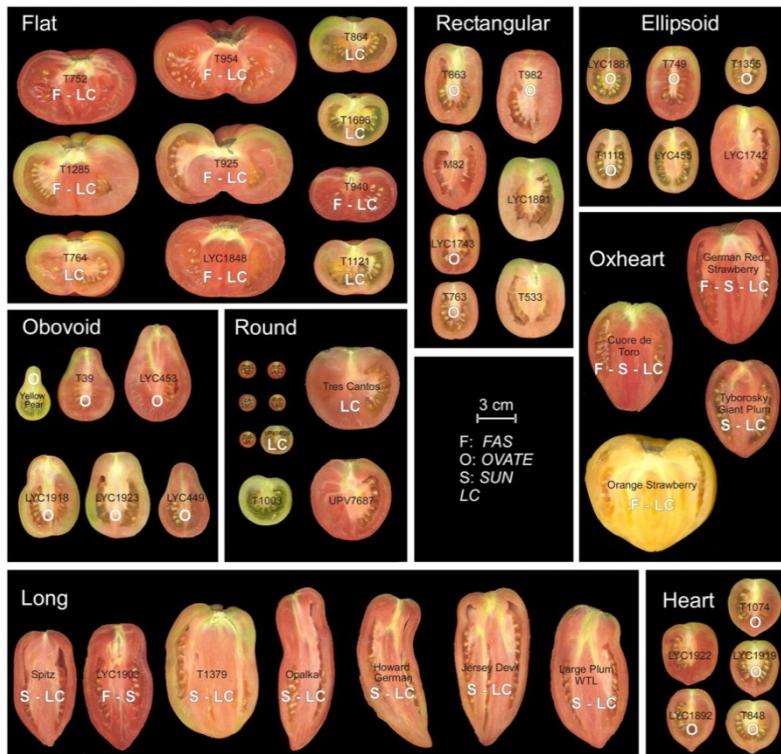


Fig. 6: Categorías de tomate según su forma.

Los frutos se identifican con el nombre de la variedad y la presencia de la mutación en los genes *SUN* (S), *OVATE* (O), *LC* (LC), y/o *FAS* (F). (Rodríguez et al. 2011).

2. Giberelinas

Las giberelinas (GAs) constituyen un amplio grupo de compuestos orgánicos, de los cuales algunos son reguladores activos del crecimiento.

2.1. Estructura química

Las GAs son ácidos diterpenos tetracíclicos, cuya estructura básica está constituida por un anillo de *ent*-giberelano. Las formas activas controlan diversos procesos del desarrollo como la germinación, la elongación del tallo, el desarrollo de tricomas, la floración y desarrollo del fruto (Olszewski et al. 2002).

Las GAs se dividen en dos grupos según presenten 19 o 20 carbonos en su estructura. El carbono 20 de la estructura (C₂₀) puede perderse por descarboxilación oxidativa formándose una γ -lactona, uniendo los carbonos C-4 y C-10 (Fig. 7).

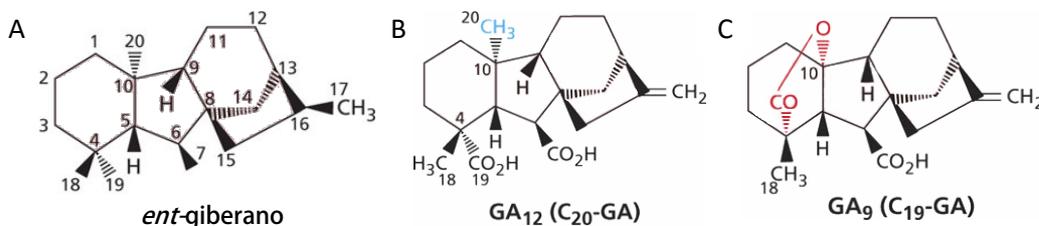


Fig. 7: Estructura química de las GAs.

A) Estructura básica de las giberelinas representada por el ent-giberano. B) Estructura de GA₁₂ representando a las GAs C₂₀. C) Estructura de la GA₉ representando a las GAs C₁₉.

2.2. Biosíntesis

La biosíntesis de GAs en plantas superiores puede dividirse en tres etapas: 1) síntesis de *ent*-kaureno a partir de geranilgeranildifosfato (GGDP); 2) conversión del *ent*-kaureno en GA₁₂; 3) formación de GAs C₂₀ y C₁₉ (Fig. 8).

2.2.1. Síntesis de *ent*-kaureno a partir de geranilgeranildifosfato (GGDP)

La primera fase en la biosíntesis de las GAs es llevada a cabo en los plastidios por parte de dos ciclasas. El primer paso en la ciclación del GGDP es catalizado por la enzima *ent*-copalildifosfato sintasa (CPS), que genera un producto intermedio, el *ent*-copalildifosfato (CDP). El segundo paso, catalizado por la enzima *ent*-kaureno sintasa (KS), transforma el CDP en el producto final *ent*-kaureno.

2.2.2. Conversión de *ent*-kaureno en GA₁₂

La segunda fase está catalizada por monoxigenasas dependientes de citocromo P450 y transcurre en el retículo endoplasmático. La enzima *ent*-kaureno oxidasa (KO) oxida repetidamente el C-19 del *ent*-kaureno generando los intermediarios *ent*-kaurenol, *ent*-kaurenal y ácido *ent*-kaurenoico. Este último, por la acción de la enzima *ent*-kaurenoico oxidasa (KAO), genera los intermediarios ácido *ent*-7 α -hidroxikaurenoico, GA₁₂-aldehído y el producto final GA₁₂, mediante sucesivas oxidaciones de los carbonos C-7 β , C-6 β y C-7.

2.2.3. Síntesis de GAs de 19 y 20 carbonos a partir de GA₁₂

La tercera fase de la ruta de biosíntesis de GAs transcurre en el citoplasma celular y se generan varias GAs intermediarias y GAs activas, mediante una serie de pasos oxidativos catalizados por dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2ODD), GA 20-oxidasas (GA20ox), y GA 3-oxidasas (GA3ox).

Esta fase se inicia con la GA₁₂, primera GA de la ruta y precursora de todas las GAs de la ruta en plantas superiores (Hedden & Thomas 2012). El proceso posterior a la GA₁₂ varía según la especie, e incluso puede ser diferente entre tejidos de una misma planta, diferenciándose dos rutas principales según la hidroxilación del C-13 (Yamaguchi 2008; Magome et al. 2013).

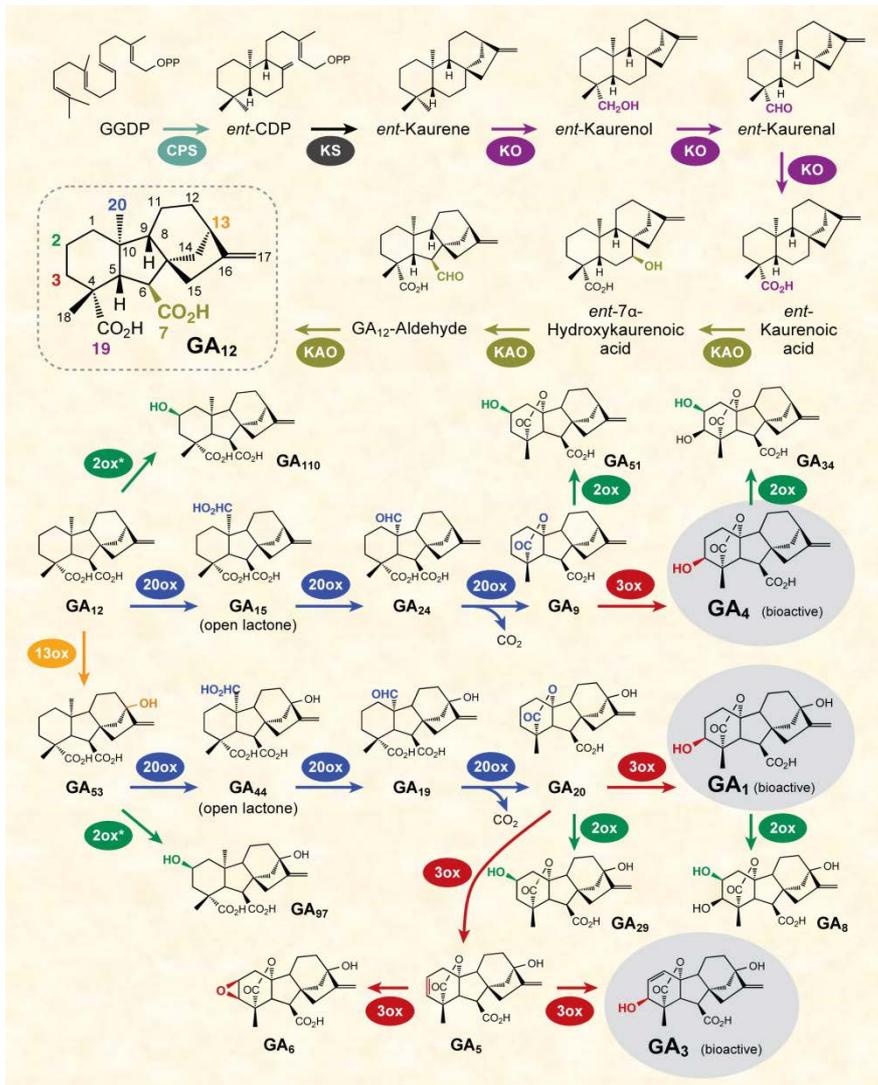


Fig. 8: Esquema de la ruta del metabolismo de GAs.

GGDP: geranilgeranildifosfato; CPS: *ent*-copalildifosfato 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 (Yamaguchi 2008).

2.2.3.1. Ruta de la hidroxilación temprana en el C-13.

Es la ruta predominante en la mayoría de las especies. Se inicia con la oxidación del C-13 de la GA₁₂ por la enzima GA 13-oxidasa (GA13ox, una mono-oxigenasa P450) transformándose en GA₅₃, el primer miembro de la ruta de síntesis de la 13-hidroxilación. Posteriormente, el C-20 de la GA₅₃ sufre dos oxidaciones consecutivas catalizadas por GA 20-oxidasa (GA20ox) dando lugar a la GA₄₄ y a la GA₁₉.

La ruta de la 13-hidroxilación continúa con la eliminación del C-20 de GA₁₉ sintetizándose GA₂₀, que es la primera GA C₁₉ de la ruta. La enzima GA 3-oxidasa (GA3ox) incorpora un grupo hidroxilo en la posición 3β de la GA₂₀, produciendo la GA activa GA₁ (Yamaguchi, 2008).

La GA₁ activa y su precursor (GA₂₀), se inactivan transformándose en GA₈ y GA₂₉, respectivamente, mediante 2β-hidroxilación catalizada por GA 2-oxidasas (GA2ox). La GA₈ y GA₂₉ pueden ser oxidadas de nuevo por GA2ox generando los productos finales GA₂₉-catabolito y GA₈-catabolito.

2.2.3.2. Ruta de la no hidroxilación temprana en el C-13.

La enzima GA20ox oxida dos veces el C-20 de la GA₁₂, dando origen a GA₁₅ y GA₂₄. Posteriormente, la GA20ox provoca la pérdida del C-20 de la GA₂₄, mediante descarboxilación, y la formación de una γ-lactona, dando origen a la GA₉, que es la primera GA C₁₉ de la ruta. Por tanto, la GA20ox es responsable de la producción de GAs C₁₉ usando GAs C₂₀ como sustrato. Finalmente, los enzimas GA3ox incorporan un grupo hidroxilo en posición β en el C-3 de GA₉, generando la GA activa GA₄ (Yamaguchi 2008).

2.3. Actividad biológica

Son pocas las GAs que tienen actividad biológica en las plantas superiores, las formas activas más comunes son la GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇, mientras que las restantes GAs son compuestos precursores o derivados de la degradación de las GAs activas (Kobayashi et al. 2000). Las formas activas normalmente poseen un grupo hidroxilo en el C-3β, un grupo carboxilo en el C-6, y una lactona entre el C-4 y el C-10 (Yamaguchi 2008).

Las GAs promueven distintos procesos en el crecimiento y desarrollo de las plantas como la germinación, elongación del tallo, expansión foliar, desarrollo de tricomas, desarrollo radicular, transición floral, elongación del tubo polínico, fructificación y desarrollo de la semilla (Huttly & Phillips 1995; Olszewski et al. 2002; Sun & Gubler 2004; Thomas et al. 2005; Yamaguchi 2008).

La ruta de la hidroxilación temprana en el C-13 es la predominante en tomate, pero la aplicación de GA₃, GA₁, GA₄ y GA₂₀ en ovarios no polinizados produce su desarrollo partenocárpico, con la siguiente efectividad GA₃ > GA₁ = GA₄ > GA₂₀. Esto indica que la GA₄ es activa en ovarios de tomate (Serrani, Fos, et al. 2007). El tomate presenta las rutas de síntesis de GA₁ y GA₄, aunque su actividad depende del tejido.

2.4. Genes implicados en el metabolismo de las GAs

Actualmente se han clonado y caracterizado todos los genes de la ruta del metabolismo de GAs. Las enzimas que catalizan los primeros pasos en la biosíntesis de GAs están codificadas por uno o dos genes. En *Arabidopsis*, CPS, KS y KO son codificadas cada una por un gen, y el alelo nulo de estos genes (*ga1*, *ga2* y *ga3*) provoca enanismo por deficiencia de GAs. En arroz, CPS, KS y KO son también codificadas por varios genes, sin embargo sólo una de las formas está implicada en la biosíntesis de GAs. En el caso de la KO, existe un cluster de 5 genes KO-like, la mutación de *OsKO2* causa un fenotipo enano severo por deficiencia de GAs, indicando que debe de ser el único gen del cluster con actividad. (Yamaguchi 2008; Hedden & Thomas 2012).

Las 2ODD, que catalizan la parte final de la ruta, son codificadas por pequeñas familias multigénicas en todas las especies que han sido estudiadas. *Arabidopsis* presenta cinco enzimas GA2Ox y cuatro GA3ox, mientras que el arroz presenta cuatro y dos, respectivamente. Los miembros de estas familias génicas pueden variar considerablemente sus niveles y patrones de expresión, y estar diferencialmente regulados. Esta multiplicidad de genes puede estar relacionada con el hecho de que la biosíntesis de GAs está regulada principalmente por la actividad de las 2ODD (Hedden & Thomas 2012).

2.4.1. Genes del metabolismo de GAs en tomate

Los genes de la ruta metabólica de GAs en tomate son conocidos, a excepción de la enzima GA13-oxidasa, la cual sólo ha sido clonada en arroz. (Magome et al. 2013)

Los genes de la primera y segunda etapa de la síntesis de GAs presentan una única copia, denominándose *SICPS*, *SIKS*, *SIKO* y *SIKAO* (Imai et al. 1996; Falara et al. 2011). Los mutantes en estos genes, deficientes en la biosíntesis, son *gib-1*, *gib-2* y *gib-3*, que afectan a las enzimas CPS, KAO y KS respectivamente (Bensen & Zeevaart 1990; Koornneef et al. 1990).

Respecto a las 2DDO, el tomate presenta cuatro enzimas GA2Ox codificadas por los genes *SIGA20ox1*, *SIGA20ox2*, *SIGA20ox3* y *SIGA20ox4*. (Rebers et al. 1999; Serrani et al. 2008). Las GA3ox están codificadas por 2 genes, *SIGA3ox1* y *SIGA3ox2* (Rebers et al. 1999). La desactivación de las GAs, es llevada a cabo por las enzimas GA2ox, y el tomate presenta 5 genes, *SIGA2ox1*, *SIGA2ox2*, *SIGA2ox3*, *SIGA2ox4* y *SIGA2ox5* (Serrani, Sanjuán, et al. 2007).

El gen *SICPS* se expresa, salvo en raíz, en todos los tejidos vegetativos, presentando la mayor expresión en entrenudos. En los órganos florales hay transcritos del gen, a excepción de los estambres. En ovarios en desarrollo hay expresión de *SICPS*, que desciende tras la antesis en ausencia de polinización. En los ovarios polinizados hay presencia de transcritos en frutos de 10 y 20 días post-antesis, con mayor intensidad en el pericarpo (Rebers et al. 1999; Serrani, Sanjuán, et al. 2007).

La expresión de los genes *SIGA20ox1*, *SIGA20ox2* y *SIGA20ox3* no se localiza en los mismos tejidos, ni con la misma intensidad, indicando posibles diferencias de funcionalidad. Todos los genes se expresan en los tejidos vegetativos aéreos, hojas, entrenudos y tejidos reproductivos. Sin embargo, en raíces sólo se detecta *SIGA20ox3*. El gen *SIGA20ox1* se expresa mayoritariamente en hojas jóvenes y, tras la polinización, en los frutos en desarrollo. En los ovarios en desarrollo es casi indetectable e inexistente si tras la antesis no ocurre la polinización. Ésta provoca su expresión en el fruto en desarrollo desde el día 5 al 20 tras la polinización. La expresión de *SIGA20ox2* se localiza también en hojas jóvenes, aunque a menor nivel que *SIGA20ox1*. En los tejidos reproductores es el gen con mayor expresión en sépalos y en los ovarios en desarrollo. Tras la antesis esta señal desaparece, pero la polinización provoca su expresión de nuevo en el fruto. Por último, el gen *SIGA20ox3*, se expresa preferiblemente en raíz y en entrenudos adultos. En el ovario

en desarrollo se expresa, aunque a un nivel menor que *SIGA20ox2*, pero mantiene la expresión en el momento de antesis y posterior. La polinización provoca un aumento de expresión, respecto a los ovarios no polinizados, que está presente desde los 5 a los 20 días (Serrani, Sanjuán, et al. 2007).

Las enzimas GA3ox1 y GA3ox2 se localizan en tejidos vegetativos y reproductivos. La expresión de *SIGA3ox1* se localiza en la raíz, a diferencia del gen *SIGA3ox2*, que no presenta expresión en este tejido. En tejido reproductivo, el gen *SIGA3ox1* se expresa en ovarios en desarrollo antes de la antesis. Posteriormente, los niveles disminuyen y se mantienen desde antesis hasta el día 20. En frutos de 10 y 20 días los transcritos se concentran principalmente en las semillas en desarrollo. Por el contrario, el gen *SIGA3ox2*, se detecta en ovarios antes de antesis y después es prácticamente indetectable en ovarios no polinizados. Tras la polinización, los niveles de expresión son muy bajos y se observa un aumento de la misma en semillas de 20 días. Aunque ambos genes estén presentes en ovarios, los resultados indican que no son limitantes para el desarrollo de los mismos (Serrani, Sanjuán, et al. 2007).

Las enzimas GA2ox catalizan la desactivación de las GAs. Existen dos tipos de GA2ox: las C₁₉-GA2ox, que tienen como sustrato las GAs de C₁₉; y las C₂₀-GA2ox, que actúan sobre las GAs C₂₀. Las C₁₉-GA2ox inactivan las GAs activas GA₁ y GA₄, por lo que su presencia en todos los tejidos de la planta está justificada. Sin embargo, los 5 miembros de la familia génica no presentan los mismos niveles de expresión ni distribución. En el tejido vegetativo no se detecta *SIGA2ox1*, que se localiza, principalmente, en ovarios en preantesis. Tras la antesis los niveles bajan ligeramente, pero se mantienen hasta el día 20 tras la antesis. La polinización no provoca cambios llamativos en su expresión. *SIGA2ox2* se transcribe principalmente en entrenudos. La flor presenta expresión de *SIGA2ox2* en todos los verticilos, y en el ovario, la expresión es más alta en no polinizados que en los polinizados. El siguiente miembro de la familia, el gen *SIGA2ox3*, se expresa en todos los tejidos vegetativos, y en los reproductivos con intensidad en los sépalos. La expresión en ovarios en desarrollo es muy alta, pero en antesis y posterior, los niveles son bajos y la polinización no los altera. La expresión de *SIGA2ox4*, se localiza en todos los tejidos vegetativos y reproductivos, salvo en los estambres. En el ovario, los niveles de transcritos son muy constantes en el tiempo entre preantesis y 20 días sin polinización. En el caso de ovarios fecundados, los niveles disminuyen con el tiempo aunque, en los frutos de 10 y 20 días, el nivel es mayor en semillas que en el pericarpo. *SIGA2ox5* se expresa en todos los órganos vegetativos, aunque especialmente en raíz y en hojas jóvenes. En la flor se expresa principalmente en ovarios en antesis y post-antesis. La polinización no varía los niveles de expresión, pero en los frutos de 10 y 20 días la expresión está restringida a las semillas (Serrani, Sanjuán, et al. 2007). Estos resultados no muestran diferencias en el patrón de expresión entre los ovarios polinizados y no polinizados que puedan indicar un papel de estos genes en el desarrollo del fruto.

2.5. Regulación de la ruta biosintética

2.5.1. Regulación homeostática

En el ciclo vital de las plantas las GAs están implicadas en multitud de procesos biológicos, por lo que las plantas tienen que ser capaces de regular el contenido en GAs activas de forma eficaz. Estudios bioquímicos en mutantes en la biosíntesis de GAs y en su respuesta en varias especies han demostrado que los niveles de GAs están controlados a través de la retroalimentación (Thomas et al. 2005). La regulación de la ruta biosintética ocurre principalmente a través de los genes *GA20ox* y *GA3ox*, y *GA2ox* ya que el incremento de la actividad de las enzimas CPS y KO no aumenta significativamente los niveles de GAs activas (Fleet et al. 2003). La regulación se lleva a cabo por retroalimentación negativa en el caso de los genes biosintéticos (*GA20ox* y *GA3ox*) y positiva en el caso de los genes catabólicos (*GA2ox*). La regulación transcripcional de las 2ODDs está inducida por la respuesta a GAs activas (Fig. 9) (Yamaguchi 2008; Serrani et al. 2008).

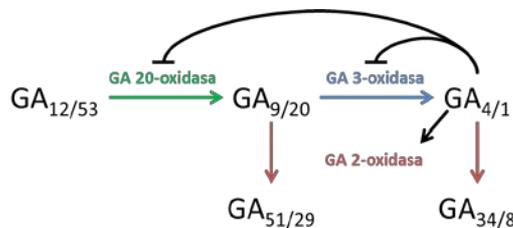


Fig. 9: Esquema de la regulación por retroalimentación negativa de genes de biosíntesis (GA 20-oxidasa, GA 3-oxidasa) y retroalimentación positiva de genes de catabolismo (GA 2-oxidasa) de GAs (Serrani, 2008).

En la regulación de la ruta metabólica de las GAs es necesaria la participación de los componentes de la ruta de señalización de GAs (ver Fig. 11), incluyendo el receptor de GAs *GID1*, la proteína *DELLA* y el complejo *SCF* (complejo *F-BOX SKP1-CULLIN* con la subunidad proteica *GID2*, en arroz; o *SLY1* en *Arabidopsis*). La implicación de la proteína *DELLA* en la regulación por retroalimentación de la ruta de síntesis de GAs, ha sido demostrada en numerosas especies mediante la caracterización de mutantes *DELLA* de pérdida y ganancia de función (Yamaguchi 2008; Hedden & Thomas 2012). Los mutantes de arroz *gid1* y *gid2* presentan alta transcripción del gen *OsGA20ox2* y altos niveles de GA_1 . Por el contrario, los mutantes con pérdida de función *DELLA* en *Arabidopsis* tienen niveles bajos de transcritos de *AtGA3ox* incluso en fondos mutantes deficientes de GAs (Yamaguchi 2008).

2.5.2. Regulación por otras hormonas

Las hormonas están implicadas en todos los procesos vegetativos y reproductivos del ciclo vital de las plantas, implicando a más de una hormona en un mismo proceso.

2.5.2.1. Auxinas

En el tomate, la aplicación de GAs y auxinas en ovarios no polinizados induce su desarrollo partenocárpico, y con la aplicación conjunta de ambas hormonas se producen frutos partenocárpicos de apariencia similar a los polinizados, esto indica la existencia de interacción entre ambas hormonas en el proceso de fructificación (Serrani, Fos, et al. 2007). Las auxinas provocan un aumento de GAs activas en el fruto mediante el aumento de expresión de los genes *CPS*, *GA20ox* y *GA3ox*, mientras que se reducen los niveles de los genes *GA2ox* (Fig. 10) (Serrani et al. 2008).

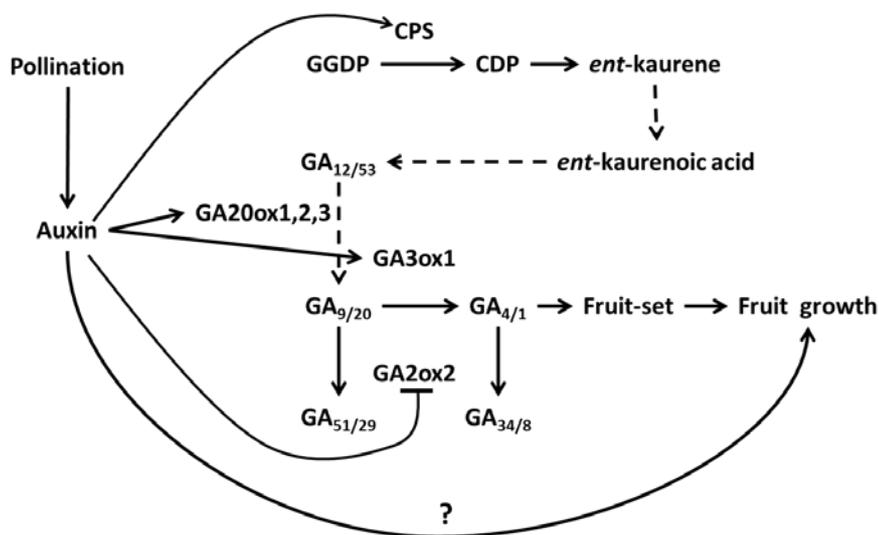


Fig. 10: Modelo de interacción de auxinas y GAs en el desarrollo y crecimiento del tomate.

Tras la polinización, o la aplicación exógena de auxinas, se produce un aumento en la transcripción de los genes de síntesis de GAs *CPS*, *GA20ox1,2,3* y *GA3ox*, así como la disminución de los transcritos de *GA20ox2*, que cataliza la desactivación de las GAs activas. Todo ello provoca un aumento de las GAs activas (Serrani et al. 2008).

2.5.2.2. Brasinosteroides

El papel de los brasinosteroides (BR) como reguladores del metabolismo de GAs es menos claro que el caso de las auxinas. En *Arabidopsis*, el mutante deficiente en BR experimenta un aumento de la expresión de *AtGA20ox1* tras la aplicación de BR activos. (Yamaguchi 2008). La expresión de *AtGA20ox2* y *AtGA3ox1* aumenta con el tratamiento de BR (Li et al. 2012). En tomate, la aplicación del esteroide activo brasinólido (BL) induce la elongación del tallo, la cual aumenta con la aplicación conjunta de GA_3 , con un efecto dependiente de la dosis, indicando que la respuesta a GAs en tomate, depende de BR (Martí et al. 2006).

2.6. Mecanismo de señalización por GAs

En la Fig. 11 se muestra un esquema resumido de la recepción y señalización de GAs. En ausencia de GAs activas, la proteína DELLA actúa inhibiendo la transcripción

genética de los genes diana de respuesta a GAs. En presencia de GAs, éstas se unen directamente al receptor GID1, produciendo un cambio conformacional en GID1 que permite la interacción con la proteína DELLA (Ueguchi-Tanaka et al. 2005; Hirano et al. 2008).

Las proteínas DELLA pertenecen a un subgrupo de la familia GRAS y actúa como regulador negativo de la cascada de señalización de GAs (Sun 2011). En la región N-terminal presenta los dominios DELLA (Asp-Glu-Leu-Leu-Ala); y el dominio TVHYNP, requeridos para la interacción con el complejo GA-GID1 (Hartweck 2008; Sun 2010; Davière & Achard 2013). La alteración en el dominio N-terminal da lugar a proteínas mutantes resistentes a la degradación, confiriendo insensibilidad a GAs (Sun & Gubler 2004; Locascio et al. 2013; Sun 2010; Itoh et al. 2002). La degradación de las proteínas DELLA se produce tras su ubiquitinación por parte del complejo SCF E3 ubiquitin ligasa, señal para la destrucción de la proteína vía proteosoma 26S (Itoh et al. 2003; Mcginnis et al. 2003; Sun & Gubler 2004).

En el tomate, la proteína DELLA se conoce como PROCERA (Martí et al. 2007; Bassel et al. 2008; Jasinski et al. 2008), y un cambio puntual en el dominio VHIID, en el mutante *procera*, da lugar a una proteína DELLA inactiva (Bassel et al. 2008; Jasinski et al. 2008), provocando la respuesta constitutiva a GAs.

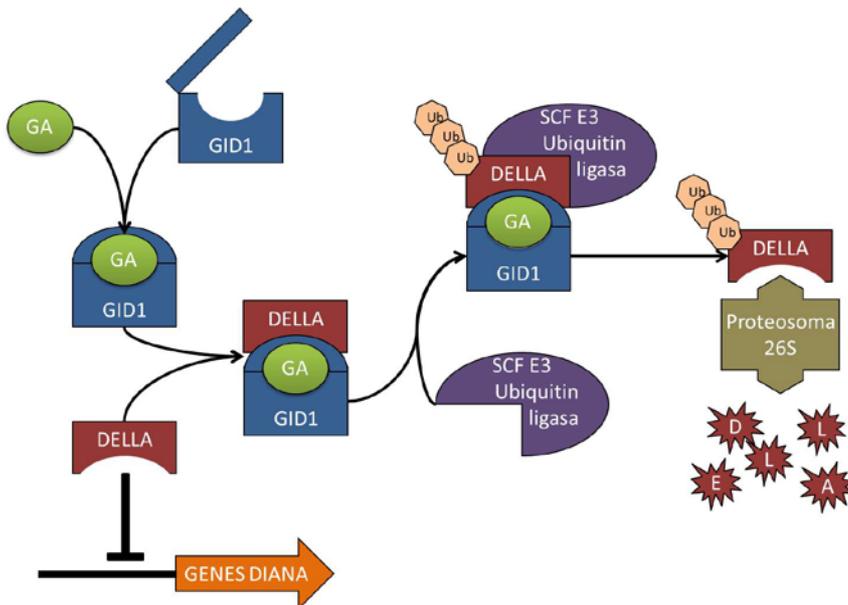


Fig. 11: Esquema de la señalización de GAs.

Tras la unión de la GAs activa con el receptor GID1, la proteína DELLA sufre la poliubiquitación, por el complejo SCF E3 Ubiquitin ligasa, y posterior degradación vía proteosoma 26S. En consecuencia, se produce la transcripción de los genes diana en respuesta a GAs. Modificado de Achard & Genschik 2009.

3. Auxinas

Las auxinas son, posiblemente, las fitohormonas más estudiadas y se han relacionado con el fototropismo y crecimiento desde finales del siglo XIX.

3.1. Estructura química

La principal auxina es el ácido indolacético (IAA), ya que es el más abundante en las plantas. Algunas especies sintetizan auxinas activas adicionales como el ácido 4-cloro indolacético (4-Cl-IAA), el ácido fenilacético (PAA), y ácido indolbutírico (IBA), aunque es probable que el IBA se convierta en IAA por β -oxidación. Las auxinas pueden encontrarse en forma libre o formando conjugados con compuestos como glucosa, myo-inositol y aminoácidos (Woodward & Bartel 2005) (Fig. 12).

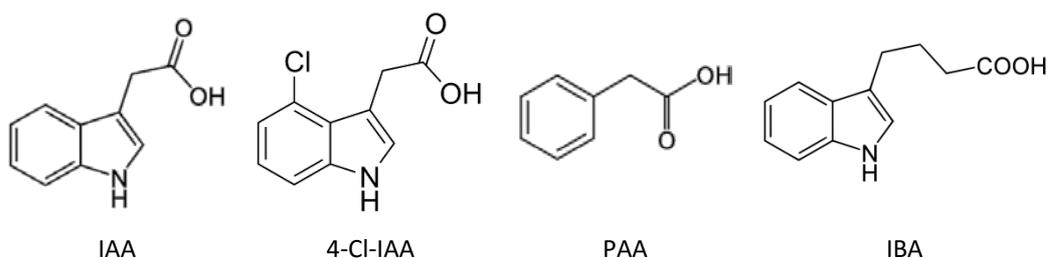


Fig. 12: Estructura química de las principales auxinas activas naturales.

Fuente: <https://es.wikipedia.org>

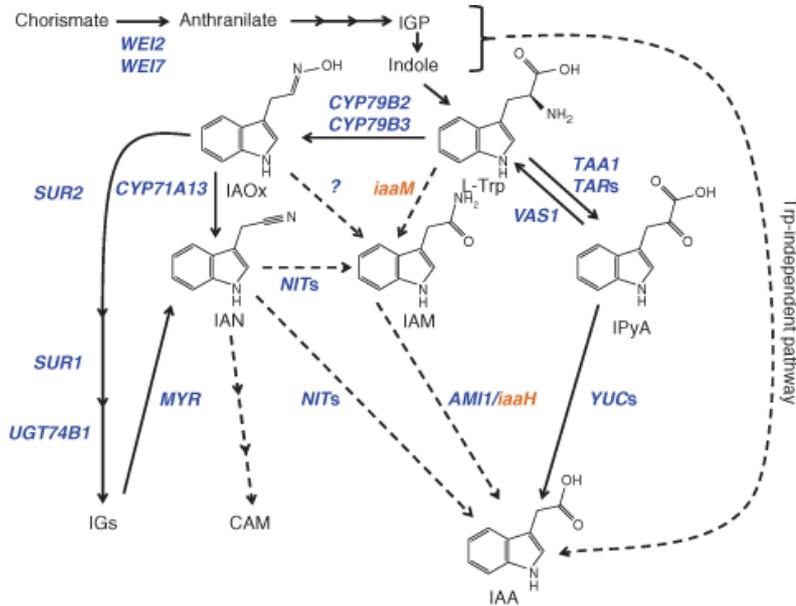
Todas las auxinas presentan un indol, o un anillo aromático, con un grupo carboxilo. Son ácidos débiles, solubles en agua y en solventes orgánicos. Para tener actividad, el anillo aromático y el grupo carboxilo tienen que estar a una distancia de 0,55Å. Partiendo de esta base química, se han sintetizado diversos compuestos con actividad auxínica, siendo los más importantes; el ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), naftalenacético (NAA), ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA) y 2,4-metilfenoxiacético (MCPA). La mayoría de estos compuestos son más estables en los tejidos que el IAA y son metabolizados más lentamente, por lo que su acción a bajas concentraciones puede ser más eficiente que el IAA (Edwin et al. 2008).

3.2. Biosíntesis de IAA

Existen dos vías principales para la síntesis de IAA: la ruta dependiente de triptófano (Trp), y la ruta independiente de Trp (Fig. 13). La ruta independiente de Trp parte del indol-3-glicerilfosfato (IGP) o del indol (Ouyang et al. 2000). La ruta más común, y más estudiada, es la ruta dependiente de Trp, de la que existen al menos 3 alternativas: indol-3-acetaldoxima (IAOx), indol-3-acetamina (IAM) y el ácido indol-3-piruvico (IPyA).

Se ha sugerido que la ruta independiente de Trp controla los niveles constitutivos de IAA y que cuando se necesitaran altos niveles de IAA, éste se sintetiza a través de la ruta dependiente de Trp (Zazimalova & Napier 2003). En tomate existen las dos rutas, pero se

supone que la dependiente de Trp es la principal en el desarrollo del fruto (Epstein et al. 2002; Ehlert et al. 2008)



3.3. Mecanismo de señalización por auxinas

En la Fig. 14 se representa esquemáticamente el proceso de señalización por auxinas.

En bajas concentraciones de auxinas, los Aux/IAAs forman heterodímeros con los ARFs, por lo que no se produce la transcripción de los genes de respuesta a auxinas. Tras la aplicación de auxinas se produce la liberación de los ARFs mediante la degradación de los Aux/IAA, lo que permite la regulación de la transcripción de los AuxREs (Fig. 14).

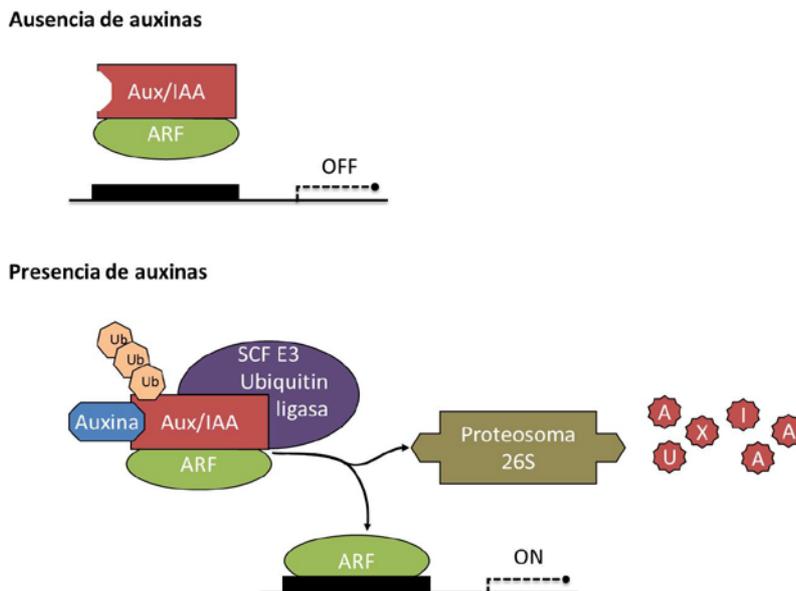


Fig. 14: Representación esquemática de la respuesta a las auxinas.

En ausencia de auxinas, las proteínas Aux/IAA forman heterodímeros con los ARF, impidiendo la transcripción. Tras la aplicación de auxinas, los heterodímeros se rompen, y los Aux/IAA se degradan vía proteosoma y se liberan los ARF, permitiendo la transcripción génica. Modificado de (De Jong et al. 2009).

4. Brasinosteroides

El esteroide activo brasinólido (BL) (Fig. 15) fue descubierto en 1979 en el polen de *Brasica napus* (Grove et al. 1979) y, aunque parecían indispensable para el crecimiento y diferenciación vegetal, no se consideraron verdaderas fitohormonas hasta el descubrimiento de los mutantes *dwarf det2* y *cpd* en *Arabidopsis* en 1996 (Szekeres et al. 1996; Li et al. 1996). Los brasinosteroides (BR) provocan cambios en la elongación celular a bajas concentraciones y, actualmente, se reconocen como fitohormonas indispensables para el crecimiento y la diferenciación celular (Clouse & Sasse 1998; Asami et al. 2005). Los mutantes deficientes en BR son más bajos que el silvestre, con hojas oscuras y curvadas, y con fertilidad reducida.

4.1. Estructura química

Los BR son esteroides polihidroxilados y presentan una estructura similar a las hormonas esteroideas de animales e insectos. El brasinosteroides con mayor actividad biológica es el brasinólido (Fig. 15).

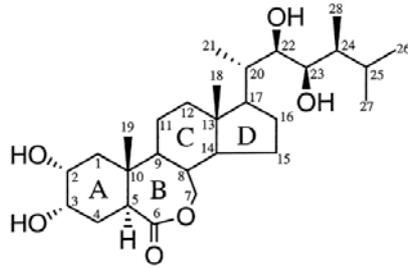


Fig. 15: Estructura química del brasinólido con numeración de los carbonos (Fujioka & Yokota 2003).

4.2. Biosíntesis

El BL deriva del esteroide de membrana campesterol a través de una serie de reducciones, hidroxilaciones, epimerizaciones y oxidaciones. Hay dos vías principales en la ruta biosintética; oxidación temprana o tardía de C-6, dependiendo si se produce la carboxilación del C-6 antes o después de la hidroxilación de la cadena lateral (C-23). Ambas vías convergen en la formación de catasterona (CS), que es el precursor de BL (Fig. 16) (Clouse & Sasse 1998).

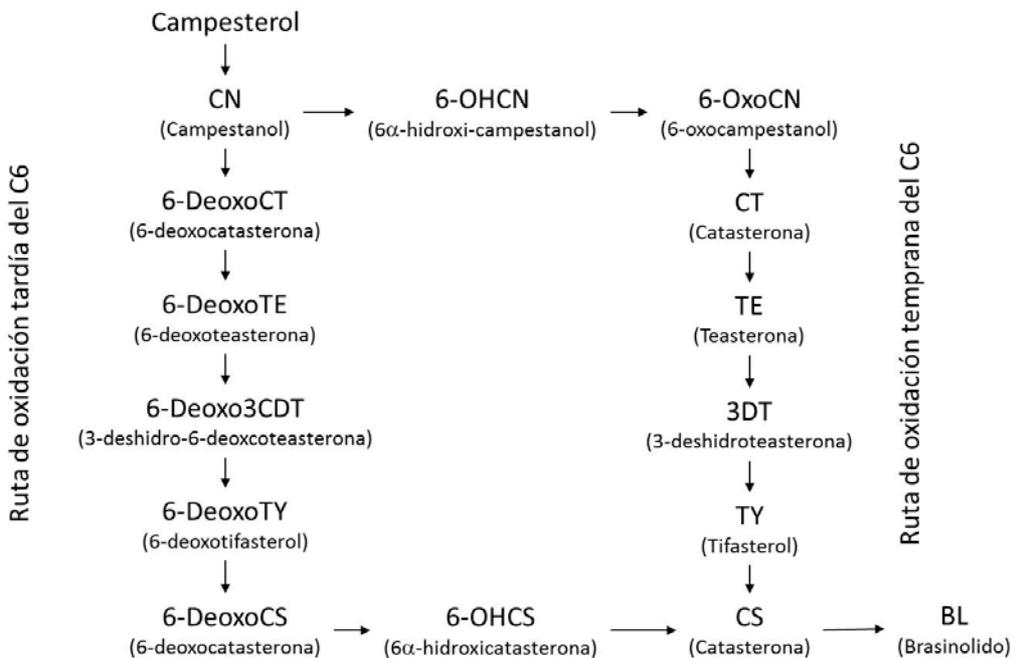


Fig. 16: Ruta de biosíntesis de BR a partir de campestanol.

Existen dos rutas de síntesis de BL, la vía de oxidación temprana del C-6 y la vía de oxidación tardía. Esta última es la ruta principal en tomate. (Modificado de Bishop et al. 1999).

En tomate, la ruta principal es la de oxidación tardía de C-6, ya que sólo se han encontrado los intermediarios de esta ruta (Bishop et al. 1999; Koka et al. 2000). El mutante *dwarf* de tomate es ortólogo del gen *BR6ox* de *Arabidopsis* y cataliza la oxidación del C-6 de la deoxocatasterona produciendo CS. La proteína codificada por *Dwarf* puede

considerarse un complejo P450 ya que cataliza dos reacciones consecutivas y muestra una alta especificidad por la 6-deoxoCS, ya que la sobreexpresión de D no provoca un incremento en el contenido de los compuestos intermedios (Bishop et al. 1999).

5. Regulación hormonal del desarrollo del fruto en tomate

5.1. Giberelinas y fructificación

Para el desarrollo del fruto es imprescindible la presencia de las GAs, como se demuestra en los siguientes trabajos:

- Tras la polinización aumentan los transcritos de los genes *SIGA20ox1*, *SIGA20ox2*, y *SIGA20ox3* y se incrementan los niveles de GA₁ en el ovario (Bohner & Bangerth 1988; Serrani, Sanjuán, et al. 2007).
- La aplicación de inhibidores de la síntesis de GAs impide el desarrollo de los ovarios polinizados, pudiéndose revertir tras la aplicación de GAs (Fos et al. 2000; Serrani, Sanjuán, et al. 2007).
- La aplicación de GAs en ovarios no polinizados provoca el desarrollo partenocárpico de frutos de tomate (Fos et al. 2000; Serrani, Fos, et al. 2007; Serrani, Sanjuán, et al. 2007).
- La supresión de la expresión de *SIGA20ox1* en tomate disminuye la viabilidad del polen y el desarrollo de frutos se produce tras la polinización con polen silvestre, aunque los frutos son partenocárpicos, debido al aborto de las semillas (Olimpieri et al. 2011).
- La sobreexpresión del gen *GA20ox1* de cítrico en tomate aumenta el contenido de GA₄ y tras la emasculación se producen frutos partenocárpicos (García-Hurtado et al. 2012).
- El silenciamiento o mutación de la proteína DELLA, que implique su pérdida de función, provoca la respuesta constitutiva a GAs y, en consecuencia, partenocarpia (Martí et al. 2007; Carrera et al. 2012).
- La mutación recesiva *pat-2* presenta altos niveles de GA₂₀ y de GA₁ y produce frutos partenocárpicos (Fos et al. 2000).
- Los mutantes *pat-3* y *pat-4* presentan un aumento en los niveles de GAs activas GA₁ y GA₃ antes de la antesis, produciendo frutos partenocárpicos (Fos et al. 2001).
- La expresión constitutiva de *SIGA20ox1* en los ovarios del mutante *pat* conlleva a altos niveles de GAs activas y a la producción de frutos partenocárpicos (Olimpieri et al. 2007).

- El tratamiento con auxinas provoca el aumento de los niveles de GAs mediante la regulación de su ruta biosintética, incrementando la transcripción de *GA20ox1*. Por tanto, el efecto de las auxinas estaría mediado por la acción de las GAs y el gen *GA20ox1* tendría un papel clave en la fructificación (Koshioka et al. 1994; Serrani, Fos, et al. 2007; Pandolfini et al. 2007; De Jong et al. 2009).
- Los ovarios tratados con auxinas presentan altos niveles de GAs, ya que se incrementan los transcritos de *GA20ox* indicando que su acción está mediada por las GAs y que el gen *GA20ox* tiene un papel clave en la fructificación (Koshioka et al. 1994; Pandolfini et al. 2007; Serrani, Fos, et al. 2007; De Jong et al. 2009; Serrani et al. 2008; Serrani et al. 2010).

5.2. Auxinas y fructificación

La intervención de las auxinas en la fructificación está basada en los siguientes hechos:

- La concentración de auxinas presenta dos picos durante el desarrollo del fruto, después de la polinización y al principio de la maduración (Gillaspy et al. 1993).
- El receptor de auxinas *SITIR1* actúa como un regulador positivo de la fructificación. Las líneas con sobreexpresión de *SITIR* muestran alteración de los niveles de expresión de los genes de respuesta a auxinas y presenta frutos partenocárpicos. Además se produce un descenso de los niveles del represor de la fructificación *SIIAA9*. (Ren et al. 2011; Goetz et al. 2007).
- El gen *SIARF7* se expresa principalmente en óvulos y placenta; y descienden en las 48 horas tras la polinización y tras la aplicación de IAA, pero no de GA₃ (Vriezen et al. 2008; De Jong et al. 2009) Las líneas transgénicas de *RNAi SIARF7* presentan frutos partenocárpicos, indicando que *SIARF7* actúa como un regulador negativo del crecimiento del fruto (De Jong et al. 2009). Las auxinas actuarían de manera independiente, o anterior, a las GAs (Ozga & Reinecke 2003).
- El factor de transcripción *ARF8* funciona como regulador negativo de la fructificación, tanto en *Arabidopsis* como en tomate. Los mutantes *arf8* muestran frutos partenocárpicos. (Goetz et al. 2007; Goetz et al. 2006).
- La proteína *SIIAA9* evita el crecimiento del fruto en ausencia de fertilización al dimerizar con ARF8 y evitar la transcripción de los AuxRes. Las líneas antisentido de *SIIAA9* presentan partenocarpia (Wang et al. 2005).
- La expresión del gen de biosíntesis de auxinas *laaM* de *P. syringae* bajo el promotor específico de óvulo *DefH9* provoca la formación de frutos partenocárpicos en tomate, tabaco y berenjena (Pandolfini et al. 2002).
- El silenciamiento de *Aucsia* incrementa los niveles de auxinas en preantesis y produce frutos partenocárpicos en tomate (Molesini et al. 2009).

- El silenciamiento del transportador de auxinas *PIN4* provoca el desarrollo de frutos partenocárpicos en tomate (Mounet et al. 2012).

5.3. Brasinosteroides y fructificación

Las siguientes observaciones y resultados sugieren un papel de los BR en la fructificación:

- Análisis de expresión de *Dwarf* en tomate muestran una fuerte expresión en los carpelos en estadios previos a la antesis (Montoya et al. 2005).
- Las flores y los frutos de los mutantes *dwarf* son más pequeños (Bishop et al. 1999).
- El incremento del tamaño del fruto producido por la aplicación exógena de BR o por la sobre-expresión de genes de síntesis en tomate y pepino, sugiere que los BR pueden estar implicados en el desarrollo del fruto (Montoya et al. 2005; Fu et al. 2008).
- La aplicación de BR promueve la maduración en discos de pericarpo de tomate a través de la producción de etileno (Vardhini & Rao 2002).
- Los BR intervienen en la fase de expansión celular en el desarrollo de los frutos de tomate, al observarse expresión de *Dwarf* en el tejido locular y en el tejido vascular del pericarpo de frutos de más de 3,2 cm (Montoya et al. 2005).

6. El cultivar Micro-Tom

El cultivar Micro-Tom de tomate se desarrolló con finalidad ornamental, a partir del cruce entre los cultivares Florida Basket y Ohio 4013-3 (Fig. 17). Este cultivar se ha constituido en un sistema adecuado para la investigación de la regulación hormonal y el desarrollo del fruto (Serrani, Sanjuán, et al. 2007; Serrani, Fos, et al. 2007).

Micro-Tom presenta un fenotipo enano, crecimiento determinado y un ciclo de vida corto. Las hojas son de un color verde oscuro, imparapinnadas, con los foliolos rugosos y bordes aserrados. Las inflorescencias son racemosas y presentan flores amarillas perfectas. La polinización es autógama y los frutos maduros son pequeños, redondos y de color rojo. No presenta capacidad partenocárpica, pero sí responde a la aplicación en los ovarios de auxinas y GAs produciendo frutos partenocárpicos (Serrani, Fos, et al. 2007).

El fenotipo enano de este cultivar se debe a varias mutaciones puntuales en los genes *Dwarf* (*D*) (que codifica una 6-deoxocatasterona deshidrogenasa, de la ruta de biosíntesis de brasinosteroides, que conduce a un missplicing); *Self-pruning* (*SP*) (controla el fenotipo determinado/indeterminado), e *Internode Length Reduction* (*Ilr*) (de función todavía desconocida a nivel molecular) (Martí et al. 2006).

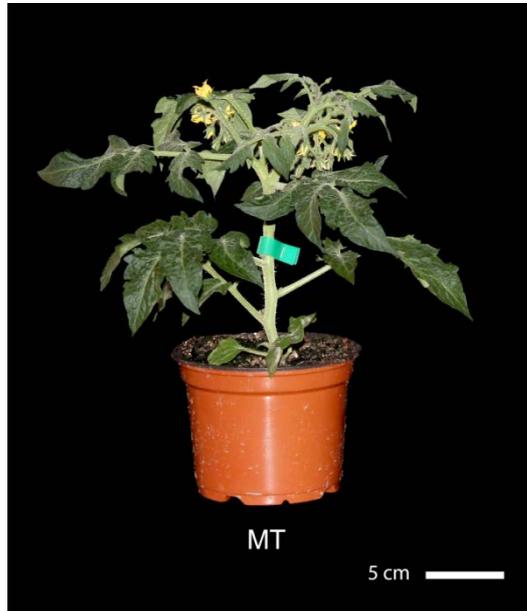


Fig. 17: Planta de MT en floración tras cinco semanas de la siembra.

Material y Métodos

1. Material vegetal

En este trabajo se ha utilizado el cultivar de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Micro-Tom (MT) y los diversos mutantes del mismo que se describen a continuación:

- MT. Cultivar de tomate que presenta: a) crecimiento determinado debido a la mutación *sp* (*self-pruning*). b) Baja estatura por deficiencia de brasinosteroides debido a la mutación *d* (*dwarf*). c) Entrenudos más cortos por la mutación *ilr* (*internode length reduction*) (Martí et al. 2006).
- *35S::CcGA20ox1*. Línea transgénica generada por Noemí Hurtado (García-Hurtado et al, 2012) que sobre-expresa el gen que codifica la enzima de síntesis de GAs *CsGA20ox1* en MT.
- *procera*. Presenta una mutación puntual en el gen *DELLA*, que produce una respuesta constitutiva a GAs (Bassel et al. 2008). La mutación se ha introgresado en el cultivar MT a partir del cultivar Condine Red (Carvalho et al. 2011).
- *Dwarf*. Posee el gen *Dwarf* silvestre, por lo que es capaz de oxidar el carbono 6 de 6-deoxocasterona para dar casterona, precursor de brasinolido, considerado el brasinosteroide natural más bioactivo. (Bishop et al. 1999; Choe 2006).
- *dgt* (Diageotropica). Mutante que presenta una respuesta a auxinas reducida ya que el gen *DGT* codifica una ciclofilina (LeCYP1) con afinidad peptidil-propil *cis-trans* isomerasa (Oh et al. 2006). La mutación original de la accesión LA1529 se introgresó en MT (Carvalho et al. 2011).
- *entire*. La delección de una base en la región codificante del gen *SIIAA9* provoca una mayor respuesta a auxinas y el fenotipo *entire* en tomate (Zhang et al. 2007). La mutación se introgresó en MT y la línea fue cedida por Lázaro EP Peres.
- *pSIGA20ox1::GUS*. Línea transgénica generada en este trabajo, que contiene 1391 pb del promotor del gen *SIGA20ox1* fusionado al gen β -glucuronidasa (GUS).
- *DR5::GUS*. Línea transgénica generada en el laboratorio, que lleva el transgén formado por el promotor del gen *DR5* de respuesta a auxinas (que contiene repeticiones de elementos de respuesta a auxinas AuxRE repetidas) (Ulmasov et al. 1997), fusionado al gen GUS.
- *F1 Dwarf x 35S::CcGA20ox1*. Línea heterocigota generada en este trabajo.

Tras generar la línea *pSIGA20ox1::GUS*, se cruzó con las líneas *35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *dgt* y *entire* con objeto de obtener líneas dobles homocigotas para los dos caracteres de interés. Así se obtuvieron las líneas siguientes, también utilizadas en el presente trabajo:

- *35S::CcGA20ox1/pSIGA20ox1::GUS*
- *procera/pSIGA20ox1::GUS*
- *Dwarf/pSIGA20ox1::GUS*
- *dgt/pSIGA20ox1::GUS*
- *entire/pSIGA20ox1::GUS*

La línea *DR5::GUS* se cruzó con las líneas *Dwarf* y *entire*, obteniendo las líneas dobles homocigotas siguientes:

- *Dwarf/DR5::GUS*
- *entire/DR5::GUS*

2. Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas y mutantes

Para la caracterización de las plantas de tomate se evaluaron diversos caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas. Los caracteres evaluados se detallan en la Tabla 1 y en la Fig. 18, donde se representa un esquema de dichas características. Los fenotipos indicados en la Tabla 1 se cuantificaron en todas las líneas mutantes usadas en este trabajo, utilizando 12 plantas por línea en el momento de la floración, es decir, en el mismo estado de desarrollo.

Tabla 1: Características fenotípicas vegetativas y reproductivas medidas

Característica	Descripción
Altura de la planta (cm)	Distancia entre los cotiledones y la hoja terminal.
Largo de la hoja (cm)	Longitud máxima de la 5ª hoja.
Ancho de la hoja (cm)	Anchura máxima de la 5ª hoja.
Nº de foliolos (n)	Presentes en la 5ª hoja.
Nº de hojas (n)	Hojas existentes hasta la primera inflorescencia.
Diámetro entrenudo (mm)	Grosor del 5º entrenudo de la planta.
Nº de flores	Pertencientes a la primera inflorescencia.
Área de los sépalos (mm²)	Superficie de los sépalos de las flores de la primera inflorescencia.
Área de los pétalos (mm²)	Superficie de los pétalos de las flores de la primera inflorescencia.
Longitud cono estaminal (mm)	Distancia entre la base de los estambres hasta la parte distal.
Longitud del pistilo (mm)	Distancia desde la base del ovario hasta el estigma.
% Partenocarpia	Porcentaje de frutos sin semillas respecto del total de frutos contabilizados.
Desarrollo de brotes axilares	Aparición de la yema axilar con una longitud mínima 0,5 cm.
Longitud rama lateral	Distancia entre la axila y la hoja terminal de la rama.
Rugosidad limbo	Dato cualitativo sobre los repliegues de la superficie de la hoja
Composición de la hoja	Hoja simple o compuesta
Borde del limbo	Forma del margen foliar

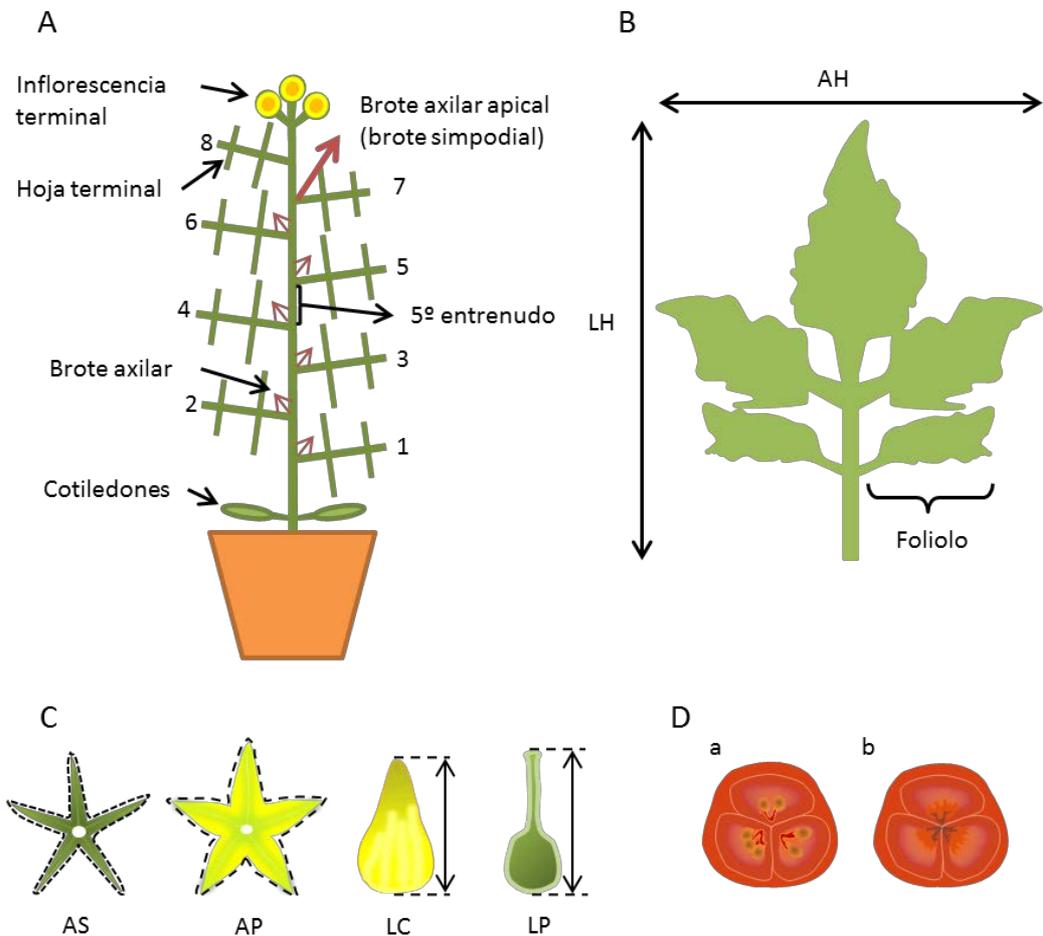


Fig. 18: Características fenotípicas medidas.

A) Esquema de una planta de tomate. Se toman los siguientes datos: altura de la planta (distancia ente cotiledones y hoja terminal); nº de hojas (incluida la hoja terminal); diámetro del 5º entrenudo; nº de flores de la inflorescencia terminal; desarrollo de brotes axilares (nº y longitud).

B) Representación de la 5ª hoja de la planta donde se mide: nº de folíolos; longitud (LH); anchura (AH).

C) Representación de las distintas partes de la flor e indicación de las medidas tomadas: área de los sépalos (AS); área de los pétalos (AP); longitud del cono estaminal (LC); longitud del pistilo (LP).

D) Esquema de un fruto con semillas (a) y partenocárpico (b). Se mide el % de partenocarpia.

3. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el editor de datos IBM SPSS Statistics v21.0. El análisis entre dos muestras se realizó mediante t-Student y entre tres o más mediante el análisis de varianza (ANOVA) de un factor. En ambos casos se consideró una $p < 0,05$. Para el análisis de homogeneidad de varianzas se empleó el estadístico de Levene y las pruebas de rango post-hoc utilizadas fueron la Prueba de Tukey, cuando las varianzas fueron iguales, y de Bonferroni con varianzas distintas.

4. Cultivo de las plantas

4.1. Cultivo en invernadero

Las semillas se sembraron en macetas de 12 cm de diámetro con una mezcla de turba:perlita:vermiculita (2:1:1), previamente humedecida, en condiciones de día largo (16 h de luz) y 24°C durante el día y 20°C durante la noche. La falta de luz natural se suplió con lámparas Osram (Powerstar HQI-BT, 400 W). Una vez germinadas las semillas se regaron 2 veces al día con solución Hoagland, utilizando un sistema de riego automático.

4.2. Cultivo en bote

La esterilización de las semillas se realizó con una solución de lejía al 30% durante 30 min con agitación alterna. Posteriormente se lavaron tres veces con agua estéril durante 5, 10 y 15 min. Las semillas esterilizadas se sembraron en botes que contenían medio de germinación solidificado. Los botes se envolvieron en papel aluminio y se incubaron en la cámara de cultivo *in vitro* a 25°C durante 48-72 h. Pasado este tiempo se quitó el papel aluminio y los botes se mantuvieron en condiciones de día largo hasta el momento de analizar las plantas.

El cultivo de semillas en bote se realizó en el ensayo de transformación genética de MT con objeto de obtener plántulas con las 2 primeras hojas verdaderas, las cuales se infectaron con *Agrobacterium*. Se utilizó para la selección de plántulas transformadas y determinación de las líneas puras.

4.3. Cultivo en placa

El cultivo de semillas en placa se utilizó para germinar semillas y obtener plántulas. Para ello se colocaron 5 capas de papel de filtro estéril por placa y se humedecieron con agua estéril. Sobre el papel se distribuyeron las semillas previamente esterilizadas y se cerraron las placas para evitar la contaminación de las mismas. Las placas se incubaron 48-72 h en oscuridad a 25°C para facilitar la germinación. Pasado este tiempo se cultivaron en condiciones de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) a 25°C en cámara de cultivo *in vitro* hasta alcanzar el estado de desarrollo deseado.

5. Tratamientos hormonales

Los tratamientos se llevaron a cabo sobre ovarios resultantes de la emasculación de las flores dos días antes de la antesis. La aplicación hormonal se realizó el día equivalente al de antesis. La aplicación de 2,4-D (Duchefa, Haarlen, The Netherlands) y de GA₃ (Sigma) se hizo en 10 µL de solución con 5% de etanol y 0,1% Tween (mojante).

6. Fertilización cruzada

Los cruces entre los distintos genotipos utilizados del cultivar MT se realizaron mediante polinización manual. Para ello se emascularon las flores receptoras 2 días antes

de la antesis, con el fin de evitar la autopolinización de la flor. El día correspondiente a la antesis se depositó el polen de las plantas donantes sobre el pistilo de las plantas receptoras. Los frutos se recogieron en estado maduro.

7. Soluciones y medios de cultivo

7.1. Cultivo *in vitro* de plantas

En la preparación de los medios de cultivos se empleó la solución mineral de Murashige y Skoog (MS) de Duchefa Biochimie B.V (Haarlem, Holanda). A continuación, en la Tabla 2, se detallan los componentes y concentraciones de los medios utilizados.

Tabla 2: Medios de cultivo utilizados en el cultivo *in vitro* de plantas indicando su composición.

Solución	Composición
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 (8 g/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)

7.2. Medios de cultivo bacteriológicos

Los medios de cultivo empleados para el cultivo bacteriano se especifican en la Tabla 3, así como su composición.

Tabla 3: Medios de cultivo bacteriano utilizados, indicando su composición.

Medio de cultivo	Composición
Medio LB (Luria-Bertani)	Triptona 10 g/L; Extracto de levadura 5 g/L; NaCl 5 g/L
Medio SOC	Triptona 20 g/L; Extracto de levadura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 20 mM Glucosa
Medio TB (Terrific Broth)	Triptona 12 g/L; Extracto de levadura 24 g/L; Glicerol 4 mL/L; 2,31 g KH ₂ PO ₄ ; 12,54 g of K ₂ HPO ₄

7.3. Antibióticos

Los medios de cultivo se suplementaron con el antibiótico necesario para la selección de bacterias transformadas. Los antibióticos y las concentraciones usadas se especifican en la Tabla 4:

Tabla 4: Antibióticos y concentraciones de uso para la selección de bacterias transformadas.

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Bacteria
Ampicilina	100	<i>E. coli</i>
Kanamicina	50	<i>E. coli</i>
Espectinomina	50	<i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>
Tetraciclina	10	<i>E. coli</i>
Rifampicina	100	<i>A. tumefaciens</i>

8. Métodos de biología molecular

8.1. Extracción de RNA

El material vegetal del que se realizaron las extracciones fue congelado en nitrógeno líquido inmediatamente tras su recolección. Una vez congelado, el material se trituró con ayuda de un mortero estéril. La posterior extracción se realizó partiendo de 100 mg de material triturado, siguiendo el protocolo de extracción “Plants and Fungi” incorporado en el RNeasy Mini Handbook del kit *RNeasy Plant Mini Kit* de QIAGEN. El RNA resultante de la extracción se trató con el kit *TURBO DNA-freeTM* de Ambion siguiendo el protocolo adjunto al kit. Posteriormente se realizó la cuantificación de RNA extraído se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Wilmington, Delaware USA) y se comprobó la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa.

8.2. Transcripción reversa

Tras la obtención de RNA se sintetizó cDNA mediante la transcripción inversa del RNA. Para ello se utilizó el kit RETROscript[®] de Ambion. Se aplicó el protocolo de dos pasos con desnaturalización con calor del RNA descrito en el manual del kit. En todos los casos se partió de 2 μg de RNA para el primer paso del protocolo y de 5 μL de la RT resultante para la reacción de PCR del segundo paso. A continuación se cuantificaron las muestras con el espectrómetro ND-1000 y se comprobó la integridad del material mediante electroforesis de gel de agarosa al 1%.

8.3. PCR (Reacción en cadena de la polimera)

La amplificación de fragmentos de DNA fue realizada mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La muestra de DNA se desnaturaliza y se incuba en presencia de la enzima polimeras y de dos oligos específicos. El resultado es la síntesis de nuevas moléculas de DNA cuya longitud está determinada por la distancia en pares de bases entre los dos oligos empleados. Con cada nuevo ciclo de reacción se dobla el número de moléculas, provocando un aumento exponencial del número de moléculas.

Para amplificar fragmentos por PCR se utilizaron diversas DNA polimerasas comerciales, entre ellas la polimerasa PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase de Agilent Technologies se empleó para las amplificaciones de fragmentos de mayor longitud y la polimerasa GoTaq® DNA Polymerase para las amplificaciones de comprobación y rutinarias. Las condiciones de las reacciones se ajustaron a los protocolos propuestos por las casas comerciales.

8.4. Electroforesis en gel de agarosa

Los geles de agarosa utilizados presentaron una concentración entre 0,8 y el 2% de agarosa disuelta en tampón TAE (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) el cual se utilizó como tampón de electroforesis. Previamente a la solidificación de la agarosa se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/mL para su visualización con el transiluminador (Macrovue transilluminator modelo 2011, LKB Produkter; Bromma Suecia).

8.5. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Una vez realizada la electroforesis, los fragmentos de interés fueron recortados del gel con ayuda de un bisturí estéril y colocado en un tubo Eppendorf previamente pesado. El protocolo que se siguió para la purificación fue el proporcionado por QIAGEN para el kit "QIAquick Gel Extraction Kit". Para la cuantificación del DNA resultante se utilizó el espectrómetro ND-1000.

8.6. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones se realizaron en tubos de 1,5 mL y con las condiciones recomendadas por la casa comercial de la enzima utilizada. Las unidades enzimáticas, el tampón y la temperatura fueron las aconsejadas en las especificaciones de las enzimas. El tiempo de reacción utilizado fue de 2 horas. El resultado de la digestión se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

8.7. Transformación de cepas bacterianas

8.7.1. Transformación de *Escherichia coli*

La transformación bacteriana se realizó con MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells y One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli*, ambos de Invitrogen, y se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante.

Para la electroporación se utilizaron cubetas estériles de 0,1 cm de separación entre electrodos (BioRad) y se sometieron a un pulso eléctrico con Gene Pulser® (BioRad).

En ambos casos las bacterias se incubaron a 37°C en agitación durante una hora. Pasado el tiempo se sembraron en placas Petri con medio LB sólido suplementado con el antibiótico selectivo de las bacterias transformadas y se incubaron entre 16-20 horas a 37°C.

8.7.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación se realizó por electroporación. Para ello se descongelaron alícuotas de 40 μL de células competentes por cada transformación a los que se añadió 1 μL de solución con el plásmido para transformar. Las condiciones del electroporador Gene Pulser® (BioRad) fueron 400 Ω , 25 μF y 1,8 kV para las cubetas de 0,1 cm de separación entre electrodos (BioRad). Seguidamente se añadió 1 mL de medio SOC para resuspender las células y se transfirieron a un tubo limpio para su incubación durante 3h a 28°C y 200 rpm. Transcurrido ese tiempo se centrifugó ligeramente y se resuspendieron las células en 100 μL de medio SOC que se distribuyó en dos placas de LB sólido con el antibiótico adecuado y se incubaron a 28°C durante 2 días.

8.8. Extracción de DNA plasmídico

Para una rápida extracción de DNA plasmídico se empleó Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. Se partió de 3 mL de un cultivo crecido 16 horas en medio líquido suplementado con antibiótico selectivo a 37°C en agitación (200 rpm). El protocolo que se siguió fue el indicado por el fabricante para la centrifugación.

9. Preparación de la construcción *pSIGA20ox1::GUS*

La construcción cedida por el Dr. Peter Hedden se encontraba (1448 pb) en el vector pART27 Para su posterior uso en la transformación de tomate, se subclonó en el vector pGREEN 0029. Para ello se extrajo el fragmento de interés del vector pART27 con la enzima de restricción NotI. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la presencia del fragmento y purificar la banda correspondiente. Paralelamente se realizó la digestión del vector pGREEN 0029 para linealizarlo con la misma enzima de restricción NotI. Con objeto de que el vector linealizado no volviera a su estado circular, se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina (Roche®). La ligación del vector abierto y el inserto se realizó usando Rapid DNA ligation Kit (Roche®), siguiendo las instrucciones del comerciante y un ratio molar de 1:3 (vector:inserto).

Tras la ligación del inserto en el vector pGREEN 0029 se procedió a la transformación de *E. coli* como se indica en el apartado 7.7.1. Posteriormente las bacterias se incubaron en placas Petri con medio LB en presencia de Kanamicina. Posteriormente se extrajo DNA plasmídico de los clones seleccionados y se comprobó por digestión con NotI la presencia del inserto. Se seleccionó el clon cuya extracción fue más limpia y se prosiguió con la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* como se indica en el apartado 7.7.2.

10. Transformación genética de tomate

La generación de plantas de tomate transgénicas se realizó mediante el método de transformación genética estable descrito por Ellul et al. 2003 con alguna modificación.

10.1. Obtención de explantes de hoja

Las primeras hojas de las plántulas de 18 días cultivadas en medio MG y crecidas en condiciones estériles de cultivo *in vitro*, se cortaron eliminando los extremos basal y apical con el propósito de aumentar la superficie de infección. Seguidamente la parte central de la hoja se colocó en placas Petri con el envés en contacto con el medio de precultivo IK 4,0/4,0. Se colocaron entre 10 y 15 explantes por placa, las cuales se sellaron con parafin y se incubaron en oscuridad 48 horas a 26°C.

10.2. Preparación del cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación

La cepa de *A. tumefaciens* LBA4404 transformada con la construcción de interés se cultivó en placa Petri con medio LB suplementado con espectinomicina y rifampicina, garantizando la supervivencia de las bacterias transformadas. Después de la incubación, una colonia se utilizó como inóculo de un cultivo de LB líquido con espectinomicina y rifampicina, que se incubó en oscuridad a 28°C en oscuridad y agitación constante. Pasadas 72 horas se inoculó un medio de cultivo de 50 mL que se mantuvo en las mismas condiciones. Este cultivo se incubó hasta que se alcanzó una OD₆₀₀ de 0,2-0,3, correspondiente a una concentración de inóculo de 10⁻² – 10⁻³ UFC/mL. Una vez alcanzado esta concentración bacteriana se prosiguió con la infección de los explantes.

10.3. Cocultivo e inducción de caulogénesis

Transcurridas 48 horas de incubación, los explantes se sumergieron durante 8 min en un cultivo de *A. tumefaciens* transformado con la construcción *pSIGA20ox1::GUS* y a la OD₆₀₀ indicada en el apartado anterior. A continuación los explantes se colocaron en placas Petri con medio de cocultivo, IK 4,0/4,0 con el envés en contacto con el medio. Las placas se sellaron y se incubaron en oscuridad en la cámara de cultivo durante dos días, tras lo cuales los explantes se sumergieron en medio de lavado suplementado con cefotaxima durante 8 min para eliminar el exceso de *A.tumefaciens*. Posteriormente, los explantes se colocaron en placas Petri con medio organogénico sin presión selectiva IK 4,0/4,0 al que se le añadió cefotaxima 400 mg/l, para detener el crecimiento bacteriano, y se incubaron cámara de cultivo. Transcurridas 48 horas los explantes se cambiaron a placas Petri con medio selectivo de inducción organogénica IKZ 4,0/4,0/1,0 y se cultivaron en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a 26°C. Se realizaron pases a medio fresco cada 3 semanas, eliminando el tejido necrosado y siempre manteniendo el envés en contacto con el medio.

10.4. Enraizamiento de los ápices producidos y aclimatación

Los callos generados en estas condiciones dan lugar a ápices, los cuales se separan del callo organogénico y se colocan en botes con medio de enraizamiento con el fin de permitir el desarrollo del sistema radicular y aéreo de la planta. Los ápices se incubaron en condiciones de día largo hasta la aparición del sistema radicular y crecimiento del brote. Las plantas generadas se mantuvieron vía propagación clonal.

Posteriormente, las plantas regeneradas *in vitro* se aclimataron a las condiciones de cultivo en invernadero indicadas en el apartado 3.1. Para ello se sacaron de los botes de cultivo y se eliminó el agar de las raíces mediante inmersión en agua. Una vez limpias las raíces, las plantas se trasplantaron a las macetas y se taparon con vasos translúcidos de plásticos, que permiten mantener una alta humedad a la vez que el paso de la luz. Al cabo de una semana se fue retirando paulatinamente el vaso hasta su completa eliminación.

10.5. Evaluación del nivel de ploidía

El nivel de ploidía se realizó por citometría de flujo mediante la cuantificación del contenido de DNA nuclear de las células de acuerdo al protocolo de (Smulders et al. 1994). Para ello se utilizaron hojas jóvenes de transformantes primarios que se trocearon en una placa Petri, con ayuda de un bisturí, y se añadió 200 μ L de tampón de extracción de núcleos (Partec). Posteriormente, la muestra se filtró con una malla de nylon de 50 μ m y se añadió 800 μ L de la solución colorante que contenía 1 mg/L de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec), que se une a las regiones de alta repetición A=T del DNA. El contenido de DNA de las células se cuantificó mediante citometría de flujo (Partec PAS-II Ploidy Analyser).

10.6. Selección de transformantes por kanamicina

La construcción *pSIGA20ox1::GUS* incorpora el gen de resistencia al antibiótico kanamicina *nptII* de *Escherichia coli*. Por ello, la selección de transformantes se realizó sembrando 50 semillas estériles en botes con medio MG y tras 7-10 días se cortó la raíz de las plántulas y se pasaron a nuevos botes con MG suplementado con kanamicina a una concentración de 100 mg/L. Transcurridos 7-15 días, se analizó la proporción de plantas resistentes (regeneraron la raíz) y las sensibles (no regeneraron la raíz) mediante test χ^2 para conocer el número de copias del transgén en las plantas transgénicas obtenidas. Se consideró significativo con una $p \leq 0,10$.

11. Hibridación *in situ*

11.1. Obtención de las sondas

Se diseñaron dos sondas a partir de dos fragmentos de cDNA del gen *SIGA20ox1* de 309 pb y 322 pb, tal como se describe en Resultados II: Análisis de la expresión de *SIGA20ox1* mediante hibridación *in situ*. El fragmento de 309 pb fue clonado en el vector pGEM[®]-T Easy (Promega). La linearización del plásmido se realizó con la enzima de restricción Sall (Roche[®]), con la consiguiente transcripción utilizando la polimerasa T7 para la obtención de la sonda sentido. La sonda antisentido se transcribió con la polimerasa SP6 y el plásmido se linearizó con la enzima de restricción NcoI (Roche[®]). El fragmento de 309 pb se amplificó mediante la técnica de PCR añadiendo a los oligos específicos del fragmento deseado, la secuencia mínima del promotor T7.

11.2. Transcripción *in vitro* de la sonda

La transcripción del plásmido linearizado y del fragmento de cDNA amplificado se realizó con el kit comercial Digoxigenin Detection Kit de Roche®. De este modo se obtuvo la sonda de RNA marcadas con digoxigenina, pudiendo ser reconocida y, por tanto localizada gracias al uso de un anticuerpo que se une a la propia digoxigenina.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se preparó una reacción de 20 µL que contenía, 2 µL de tampón de transcripción 10X, 2 µL de DIG RNA Labeling Mix, 2 µL de inhibidor de RNasas y 2 µL de RNA polimerasa. En el caso de la sonda proveniente de cDNA amplificado se añadieron 200-400 ng de molde para la reacción. La transcripción de la sonda a partir del plásmido linearizado se realizó añadiendo entre 1 y 2 µg de molde.

La reacción se incubó durante 2 h a 37°C, tras la cual se realizó una electroforesis de gel de agarosa con 1 µL de la reacción para comprobar la eficiencia y calidad de la transcripción. Seguidamente se precipitó la transcripción durante al menos 2 horas a -20°C tras la adición de 20 µL de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y de etanol absoluto. La sonda se centrifugó durante 30 min a 14 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 200 µL de etanol 70%, centrifugándolo otros 15 min a 14000 rpm a 4°C. Después de eliminar el sobrenadante se dejó secar completamente el etanol y la sonda se resuspendió en 40 µL de H₂O.

11.3. Fijación del material

Las muestras se sumergieron en la solución fijadora compuesta por ρ-formaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2. A continuación se realizaron tres pulsos de vacío de 5 min cada uno, para aumentar la penetración del fijador en el tejido. Las muestras se dejaron en la solución fijadora 16 horas a 4°C.

11.4. Deshidratación del material

Transcurridas las 16 horas se realizaron dos lavados de las muestras en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2 y se prosiguió a la deshidratación del tejido con concentraciones crecientes de etanol del 10 al 100% con cambios cada 20 min. Posteriormente, las muestras se pasaron por una serie de soluciones de concentración creciente de xileno hasta alcanzar el 100% de xileno.

11.5. Inclusión del material en parafina

El material vegetal sumergido en xileno se incubó 30 min a 37°C y se añadieron perlas de parafina, de modo que ésta sustituya el xileno en los tejidos. A medida que se añadió parafina, se subió la temperatura de incubación hasta los 60°C en dos días de incubación. Alcanzada la temperatura final se realizaron tres cambios de parafina durante tres días. Al final del tercer día se dejaron enfriar las muestras, solidificándose la parafina.

11.6. Corte histológico de las muestras

Los cortes de las muestras se realizaron en secciones de 8 μm de espesor utilizando un micrótomo (Leica). Las secciones se colocaron sobre portaobjetos tratados con polylisina y se dejaron 16 horas a 40°C para la adhesión del tejido al portaobjetos.

11.7. Desparafinado de los portaobjetos

Las fases sucesivas tienen como objeto la eliminación de la parafina de las secciones histológicas, su rehidratación, la eliminación de las proteínas para aumentar su permeabilidad y la sucesiva nueva deshidratación. Para ello las secciones se desparafinaron con dos lavados de 10 min en xileno 100%, seguidos de dos lavados de 10 min en etanol 100%. La hidratación del tejido se realizó con una serie de lavados de 5 min cada uno en concentraciones decrecientes de etanol (70, 50 y 30%). La eliminación del etanol de la muestra se realizó con un lavado de 5 min en la solución salina 2X SSC. La permeabilización del tejido, para incrementar la accesibilidad de la sonda, se efectuó con un lavado de 10 min a 37°C con Proteinasa K (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en 2X SSC. La proteinasa se bloqueó sumergiendo los portaobjetos en una solución con Glicina 2% en 2X SSC durante 5 min. A continuación se refijó el tejido con 1,6% Formaldehído en 2X SSC durante 5 min. Tras un nuevo lavado en 2X SSC, se trataron las muestras con ácido acético al 20% con objeto de reducir las uniones inespecíficas de la sonda. Posteriormente se realizó un lavado de 5 min en 2X SSC y se deshidrataron las muestras con concentraciones crecientes de etanol.

11.8. Hibridación de la sonda

Se procedió a preparar la solución de hibridación (SHi) indicada en la Tabla 5 añadiendo las siguientes soluciones a la concentración final indicada.

Finalizada la mezcla se incubó durante 10 min a 65°C y a continuación se distribuyó 80 μL de solución sobre cada portaobjetos. Las secciones se cubrieron con un cubreobjetos y se colocaron en una caja húmeda que se mantuvo toda la noche a 48°C.

11.9. Lavados posthibridación y detección inmunológica de la señal

Pasado el tiempo de hibridación, los portaobjetos se sumergieron en 2X SSC a 48°C para permitir la caída de los cubreobjetos. Posteriormente se realizaron dos lavados en 2X SSC de 30 min a 48°C. Las muestras se sumergieron en 1X TE 500mM NaCl durante 30 min y después se eliminaron los posibles RNA monocatenarios con un tratamiento con Rnasa A durante 30 min a 37°C. A continuación se efectuó un lavado de 30 min con 1X TE, 500 mM NaCl, seguidos de 2 lavados con 1X SSC y otros dos con 0,5X SSC, todos ellos de 30 min. Posteriormente se realizó un cambio de tampón con un lavado de 5 min en el tampón 1 (100 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl), al cual le siguió 1 hora en tampón 2 (tampón 1 + 0,5% Blocking Reagent (Roche[®])). Tras el bloqueo de las muestras se lavaron una hora en tampón 3 (tampón 1 + 0,3% Triton X-100 + 1% BSA). La hibridación del anticuerpo se realizó durante una hora en tampón 4 (tampón 3 + Anti-Digoxigenin AP (Roche[®]) 1:3000) y se continuó con cuatro lavados de 5 min en tampón 3. Se realizó un lavado de transición

de 5 min en tampón 1 seguido de otro de 5 min en tampón 5 (100 mM Tris-HCl, pH 9,5 + 150 mM NaCl + 50 mM MgCl₂) para el equilibrio de las muestras. Después se sumergieron los portaobjetos durante 24-36 horas en oscuridad en tampón 6 (tampón 5 + 2 µL /mL de NBT (75 mg/mL) + 1,5 µL /mL de BCIP (50 mg/mL).

La reacción se detuvo sumergiendo las secciones en agua durante 5 min y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol. Posteriormente se dejaron secar los portas en la campana de flujo y se montaron con Merckglass (Merck®) para su posterior visualización en el microscopio óptico.

Tabla 5: Componentes y concentración del tampón de hibridación de la sondas

Componente	Concentración final	Volumen en 1mL de SL
Formamida	50%	500 µL
tRNA (20 mg/mL)	0,5 mg/mL	25 µL
Poly-A (10 mg/mL)	0,1 mg/mL	10 µL
50X TE	1X	40 µL
DTT 1 M	0,1 M	100 µL
Dextran sulfato 50%	20%	200 µL
Denhardt's	2%	20 µL
NaCl 5 M	0,3 M	60 µL
Sonda	Variable según la concentración	X µL
H ₂ O		Hasta 1 mL

12. Análisis de actividad GUS

El material se recogió en fresco y se fijaron en 90% de acetona durante 20 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se hizo un lavado con agua destilada de 1 min y otro lavado de 5 min la solución de lavado (Tabla 6). A continuación se sumergió en la solución de tinción (Tabla 6) y se sometió a vacío durante 10 min. Las muestras sumergidas en la solución se incubaron 16 horas a 37°C en oscuridad. Posteriormente se deshidrataron las muestras con concentraciones crecientes de etanol (20, 35 y 50%). Cada lavado se realizó durante 30 min a temperatura ambiente. Para la fijación de los tejidos se empleó FAE (50% etanol absoluto; 10% ácido acético glacial; 5% formaldehído) aplicando nuevamente dos pulsos de vacío de 5 min, y dejándolos 16 horas a 4°C. Las muestras se almacenaron en etanol al 70% a 4°C hasta su procesado.

12.1. Actividad GUS en cortes histológicos

Las muestras tratadas como se indica anteriormente, se deshidrataron con lavados con concentraciones crecientes de etanol de 30 min cada uno (70, 80, 90, 96 y 100%). Las muestras se mantuvieron 16 horas en etanol 100% y después se sumergieron en soluciones de distinta proporción de etanol e HistoClear. Los lavados fueron de una hora cada uno y las proporciones de las soluciones 1:2, 1:1, 2:1 de etanol:HistoClear. Finalmente se hicieron dos lavados con HistoClear puro y se mantuvieron las muestras 16 horas.

La siguiente inclusión en parafina de las muestras se realizó en distintos pasos de al menos 3 horas de duración cada uno. Las soluciones fueron Histoclear:parafina 1:2, 1:1, 2:1 y parafina 100%, se mantuvieron a una temperatura de 58-60°C para asegurarse la correcta disolución de la parafina. Después se realizó un cambio de parafina 100% y se dejaron las muestras a 58-60°C en la estufa durante 16 horas. Los dos días siguientes se realizaron al menos 3 lavados al día de al menos 3 horas de parafina 100%. Finalmente se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente solidificándose la parafina.

Los cortes histológicos que se realizaron de estas muestras se hicieron en un micrótopo Microm HM330 con un espesor de 20 µm.

Tabla 6: Componentes de las soluciones de lavado y tinción para la detección de la actividad GUS.

Solución de lavado	Solución de tinción
50 mM Tampón fosfato sódico pH 7,0	50 mM Tampón fosfato sódico pH 7,0
5 mM Ferricianuro de potasio	5 mM Ferricianuro de potasio
5 mM Ferrocianuro de potasio	5 mM Ferrocianuro de potasio
0,2% Tritón -X-100	0,2% Tritón -X-100
H ₂ O	2 mM X-Glc
	H ₂ O

12.2. Actividad GUS en plántulas

Las muestras tratadas como se indica en el apartado 11 se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 90, 96 y 100%). Posteriormente se visualizaron en la lupa binocular Leica MZ16F.

13. Inmunolocalización de IAA

13.1. Procesado de las muestras

El material fresco se prefijó con el reactivo EDAC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcabodiimide hydrochloride de Sigma) al 3% en PBS 1X durante una hora en hielo. Seguidamente se realizó la fijación de las muestras con FAE (50% ETOH; 5% ácido acético glacial; 4% de formaldehído; en PBS 1X) durante 16 horas a 4°C. La deshidratación posterior se realizó mediante soluciones crecientes de etanol del 50 al 100%. Posteriormente las muestras se trataron como se indica en el apartado 10.5.

13.2 Inmunodetección colorimétrica

Los cortes histológicos de 8 µm de grosor se desparafinaron con Xilol y se hidrataron en series decrecientes de etanol (100%, 90%, 50%) de 20 min cada una, y se incubaron en PBS 1X dos veces durante 5 min. Una vez hidratadas, las muestras se sumergieron una hora en una solución de bloqueo (1,5% glicina; 0,1% tween 20; 5% BSA; en PBS 1X). Posteriormente se realizaron dos lavados de 5 min, el primero con una solución de

concentración baja de sal (0,88% NaCl; 0,1% tween 20; 0,8% BSA; en PBS 1X), y el segundo con BSA 0,8% (en PBS 1X).

El siguiente paso fue la incubación durante 5 horas con el anticuerpo primario IAA *índole-3-acetic acid* (N1) (Rabbit polyclonal/AS09 421 de Agrisera), a una dilución de 1:100 en BSA 0,8%. Pasado el tiempo de reacción se realizaron dos lavados de 10 min con una solución de alta concentración de sal (2,9% NaCl; 0,1% tween 20; 1% BSA; en PBS 1X), y otro lavado de 10 min con la solución de concentración baja de sal. Las muestras se lavaron una vez más durante 5min en BSA 0,8% y se procedió a la incubación durante 3 horas con el anticuerpo secundario anti-Mouse IgG-AP (Santa Cruz Biotechnology) una dilución de 1:250. A la incubación se sucedieron dos lavados de 15 min con la solución de concentración baja de sal y un lavado con agua desionizada.

La detección de la señal se realizó sumergiendo las muestras 5 min en la solución de lavado (100 mM Tris; 100 mM NaCl; 50 M MgCl₂ a pH 9,5). Seguidamente se sumergieron en la misma solución que la anterior suplementada con 75 µL de NBT (100 mg/mL) y 75 µL de BCIP (50 mg/mL), ambos de Roche®. Se incubó en oscuridad hasta que se observó la señal y en ese momento se detuvo la reacción sumergiendo las muestras en agua.

Objetivos

Hemos visto en la Introducción que la fructificación del tomate depende principalmente de las hormonas GAs y auxinas, y que estas últimas ejercen en parte su función regulando el metabolismo (biosíntesis y catabolismo) de GAs. Durante la fructificación del tomate las concentraciones de GA₂₀ y GA₁ (GA activa) en el ovario aumentan, así como la expresión de genes que codifican GA 20-oxidasas (GA20ox), en particular *SIGA20ox1*, lo que sugiere que la biosíntesis de GA₂₀ puede ser un paso regulador del proceso. Por ello, con objeto de profundizar en el conocimiento de la expresión de *SIGA20ox1* durante la fructificación del tomate, y del efecto de otras hormonas (sobre todo auxina) en dicha expresión, en el presente trabajo se plantearon dos grandes objetivos:

- A. Conocer la localización espacial y temporal de la expresión de *SIGA20ox1* en el ovario durante la fructificación.
- B. Determinar la localización en el ovario del IAA (la auxina más importante) durante la fructificación.

Para llevar a cabo los objetivos anteriores se plantearon los objetivos parciales siguientes:

1. Introducir los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* o *DR5::GUS* en diversas líneas mutantes de tomate cultivar Micro-Tom, alteradas en genes que codifican la biosíntesis o modo de acción de GAs, auxina o brasinosteroides, y caracterizar fenotípicamente estas nuevas líneas.
2. Analizar los efectos de la polinización y aplicación de GA y auxina sobre la expresión del promotor de *SIGA20ox1* en las plantas transgénicas anteriores, utilizando el gen delator *GUS*.
3. Caracterizar el efecto de la polinización sobre la expresión de *SIGA20ox1* en el ovario mediante el análisis *in situ* de transcritos de dicho gen.
4. Estudiar la localización de la expresión del gen de respuesta a auxinas *DR5* utilizando el gen delator *GUS* en ovarios de plantas transgénicas *DR5::GUS* durante la fructificación.
5. Caracterizar el efecto de la polinización sobre el contenido de IAA en el ovario en desarrollo mediante inmunolocalización.

Resultados I

Caracterización fenotípica de MT y sus mutantes

Con objeto de definir y comparar las líneas mutantes (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *dgt* y *entire*), con el cultivar original Micro-Tom (MT), se cuantificaron diversos aspectos fisiológicos, tanto vegetativos como reproductivos, que se describen en los apartados 1 y 2 de material y métodos. De esta forma se analizaron las posibles diferencias fenotípicas debidas a las mutaciones y el posible efecto sobre el fenotipo de la incorporación del transgén *pSIGA20ox1::GUS* o *DR5::GUS*. En la Fig. 19 se muestran la foto de plantas representativas de cada línea utilizada en el trabajo.



Fig. 19: Plantas representativas de las líneas de MT utilizadas.

La incorporación de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* no alteró significativamente las características fenotípicas de las líneas mutantes (Ver Tablas 7 y 8). Fila superior: línea MT y líneas transgénicas con los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS*. Fila intermedia: línea de sobreexpresión de GAs (*35S::CsGA20ox1*), mutante DELLA (*procera*), mutante D de síntesis de brasinosteroides (*Dwarf*) e híbrido de *35S::CsGA20ox1* y *Dwarf*. Fila inferior: Línea insensible a auxinas (*dgt*) y mutante en el factor de transcripción *SIIAA9* (*entire*).

1. Caracterización vegetativa.

En las Tablas 7 y 8 se dan los datos de los caracteres fenotípicos vegetativos de las líneas utilizadas en el trabajo. Las comparaciones que se describen a continuación se llevaron a cabo entre MT y los distintos mutantes *35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *Dwarf/35S::CcGA20ox1*, *dgt* y *entire*. Posteriormente se analizó el posible efecto de la introducción de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* sobre el fenotipo.

Tabla 7: Características fenotípicas vegetativas de las líneas de MT con el transgén *pSIGA20ox1::GUS* y sus respectivos controles

Los datos son medias de 12 plantas \pm SEM. La incorporación del transgén *pSIGA20ox1::GUS* no produjo en ningún caso modificaciones significativas en las características fenotípicas de las plantas (mediante test t-student). Ver Fig. 18 para más detalles.

	Altura planta (cm)	5ª Hoja			nº hojas (n)	Diámetro tallo (mm)
		Longitud (cm)	Ancho (cm)	nº foliolos (n)		
MT	9,3 \pm 0,2	11,6 \pm 0,2	11,1 \pm 0,2	5,0 \pm 0,0	7,4 \pm 0,1	5,7 \pm 0,1
<i>pSIGA20ox1::GUS</i>	9,0 \pm 0,3	11,7 \pm 0,2	11,0 \pm 0,3	5,2 \pm 0,1	7,4 \pm 0,2	5,7 \pm 0,1
35S::CcGA20ox1	22,0 \pm 0,4	12,4 \pm 0,4	9,1 \pm 0,3	5,0 \pm 0,0	9,4 \pm 0,2	4,9 \pm 0,1
<i>35::CsGA20ox1/pSIGA20ox1::GUS</i>	21,4 \pm 0,4	12,5 \pm 0,3	9,1 \pm 0,3	5,0 \pm 0,0	9,3 \pm 0,2	4,8 \pm 0,1
procera	17,8 \pm 0,2	14,3 \pm 0,3	10,4 \pm 0,2	5,1 \pm 0,1	9,1 \pm 0,1	5,5 \pm 0,2
<i>procera/pSIGA20ox1::GUS</i>	17,7 \pm 0,5	14,7 \pm 0,5	10,6 \pm 0,3	5,1 \pm 0,1	9,2 \pm 0,1	5,5 \pm 0,1
Dwarf	23,9 \pm 0,4	22,3 \pm 0,5	16,7 \pm 0,6	11,2 \pm 0,4	10,0 \pm 0,1	5,8 \pm 0,1
<i>Dwarf/pSIGA20ox1::GUS</i>	23,8 \pm 0,5	22,3 \pm 0,4	16,0 \pm 0,6	11,1 \pm 0,4	9,9 \pm 0,1	5,7 \pm 0,1
Dwarf/35S::CcGA20ox1	43,1 \pm 0,6	18,9 \pm 0,4	14,5 \pm 0,4	6,5 \pm 0,3	10,1 \pm 0,2	4,6 \pm 0,1
<i>Dwarf/35::CsGA20ox1/pSIGA20ox1::GUS</i>	42,6 \pm 0,8	18,7 \pm 0,4	14,6 \pm 0,4	6,7 \pm 0,4	10,0 \pm 0,3	4,6 \pm 0,1
dgt	7,1 \pm 0,3	10,4 \pm 0,4	8,4 \pm 0,2	5,1 \pm 0,1	6,4 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1
<i>dgt/pSIGA20ox1::GUS</i>	7,3 \pm 0,4	10,5 \pm 0,4	8,6 \pm 0,2	5,2 \pm 0,1	6,5 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1
entire	12,1 \pm 0,4	12,7 \pm 0,2	5,7 \pm 0,2	1,1 \pm 0,0	8,3 \pm 0,2	6,3 \pm 0,2
<i>entire/pSIGA20ox1::GUS</i>	12,1 \pm 0,5	12,3 \pm 0,3	5,8 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	8,2 \pm 0,2	6,2 \pm 0,2

Tabla 8: Características fenotípicas vegetativas de las líneas de MT con el transgén *DR5::GUS* y sus respectivos controles.

Los datos son medias de 12 plantas \pm SEM. La incorporación del transgén *DR5::GUS* no produjo en ningún caso modificaciones significativas en las características fenotípicas de las plantas (mediante test t-student). Ver Fig. 18 para más detalles.

	Altura planta (cm)	5ª Hoja			Diámetro tallo (mm)
		Largo (cm)	Ancho (cm)	Nº foliolos (n)	
MT	9,3 \pm 0,2	11,6 \pm 0,2	11,1 \pm 0,2	5,0 \pm 0,0	7,4 \pm 0,1
<i>DR5::GUS</i>	9,1 \pm 0,2	11,3 \pm 0,2	11,2 \pm 0,4	5,1 \pm 0,1	7,5 \pm 0,2
Dwarf	23,9 \pm 0,4	22,3 \pm 0,5	16,7 \pm 0,6	11,2 \pm 0,4	10,0 \pm 0,1
<i>Dwarf/DR5::GUS</i>	23,9 \pm 0,8	22,1 \pm 0,4	16,1 \pm 0,6	11,0 \pm 0,4	10,2 \pm 0,2
entire	12,1 \pm 0,4	12,7 \pm 0,2	5,7 \pm 0,2	1,1 \pm 0,0	8,3 \pm 0,2
<i>entire/DR5::GUS</i>	12,6 \pm 0,5	12,8 \pm 0,4	6,0 \pm 0,2	1,0 \pm 0,0	8,4 \pm 0,3

1.1. Altura

Las líneas *35S::CcGA20ox1* y *procera* presentaron una altura significativamente mayor que MT.

La presencia de brasinosteroide (BR) activo en *Dwarf* aumentó significativamente la altura respecto a MT. Está descrito que los BR están implicados en el crecimiento de las plantas, ya que la mutación en el gen *DWARF* provoca un fenotipo enano (Szekeres et al. 1996).

La altura del híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* fue significativamente superior al de MT y también fue más alto que los parentales *35S::CcGA20ox1* y *Dwarf*.

La línea *dgt* fue la de menor altura, siendo estadísticamente diferente al resto de los genotipos en estudio.

entire tuvo una altura significativamente mayor que MT, aunque no alcanzó la altura de las demás líneas.

1.2. Morfología de la hoja

Como dijimos anteriormente, se analizó la morfología de la hoja 5ª como representativa de la planta. En la Fig. 20 se muestra una foto de hojas representativas de todas las líneas estudiadas.

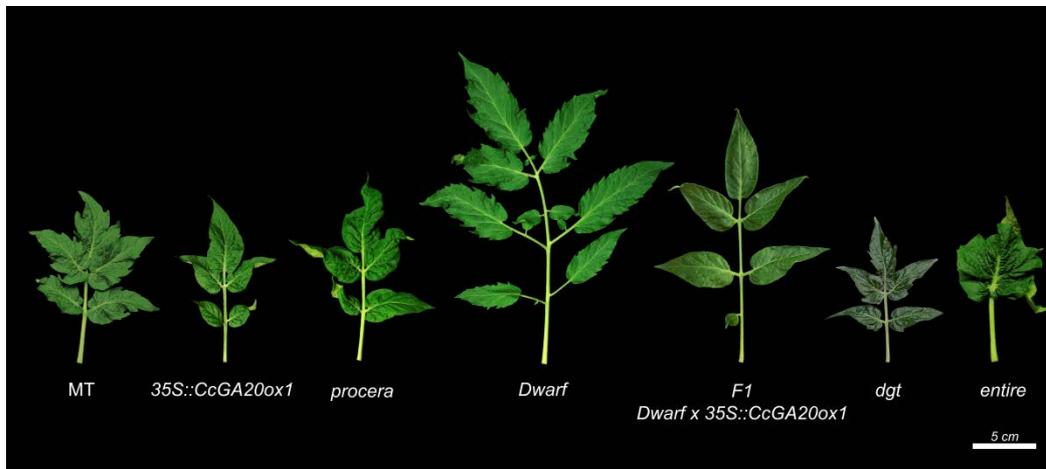


Fig. 20: Foto representativa de la 5ª hoja completamente desarrollada de las distintas líneas.

Obsérvese el mayor tamaño y mayor número de folíolos en el caso de *Dwarf*, así como la hoja simple en el caso de *entire*.

La hoja de MT presentó cinco folíolos con bordes aserrados y con la superficie rugosa. Sus dimensiones medias fueron de $11,6 \pm 0,2$ cm de largo y $11,1 \pm 0,2$ cm de ancho.

Comparadas con MT, las hojas de *35S::CcGA20ox1* no mostraron diferencias en longitud, pero sí fueron significativamente menos anchas (18%). El número de folíolos no

se vio afectado, pero tuvieron bordes lisos y una superficie del limbo menos rugosa que MT.

procera mostró el mismo número de foliolos que MT, pero con bordes lisos. Así mismo, la superficie de los foliolos fue menos rugosa que en MT. Las hojas de *procera* fueron significativamente más largas, pero igual de anchas que MT.

La longitud y anchura de la hoja de la línea *Dwarf* aumentó significativamente respecto a MT. La complejidad de la hoja se vio afectada llegando a tener el doble de foliolos que MT. El borde de las hojas fue aserrado, y la superficie del limbo fue menos rugosa que en MT.

La hoja del híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* presentó bordes no aserrados y superficie del limbo no rugosa. El número de foliolos fue igual a MT. La longitud y anchura de la hoja aumentó significativamente respecto a MT. En comparación con los parentales, el híbrido tuvo significativamente menos foliolos que *Dwarf*, pero los mismos que *35S::CcGA20ox1*. Las dimensiones de la hoja fueron significativamente distintas a ambos parentales, situando a *Dwarf/35S::CcGA20ox1* en un punto intermedio entre *35S::CcGA20ox1* y *Dwarf*.

dgt mostró hojas iguales en longitud, pero significativamente menos anchas que MT. Los bordes de los foliolos fueron menos aserrados que en MT, y su superficie más lisa. El número de foliolos no se vio alterado respecto a MT. *dgt* fue la línea con color de la hoja de un verde más oscuro.

entire presentó una hoja simple con la superficie del limbo muy rugosa y bordes aserrados. La longitud de la hoja en *entire* fue similar a MT, pero el ancho fue significativamente menor, siendo las hojas más estrechas entre todas las analizadas en este trabajo.

1.3. Número de hojas

MT presentó una media de $7,4 \pm 0,1$ hojas hasta la primera inflorescencia. Considerando que se distribuyen en $9,3 \pm 0,2$ cm de altura total, se obtiene una planta de aspecto redondeado como se observa en la Fig. 19.

35S::CcGA20ox1 y *procera* tuvieron un aumento significativo del número de hojas respecto a MT ($9,4 \pm 0,2$ y $9,1 \pm 0,1$ hojas, respectivamente), por ello el aspecto de ambas líneas fue más estilizado que el de MT.

Dwarf presentó $10,0 \pm 0,1$ hojas frente a las $7,4 \pm 0,1$ de MT. El resultado fue una la planta más esbelta que MT.

El híbrido *35S::CcGA20ox1/Dwarf* tuvo $10,1 \pm 0,2$ hojas antes de la inflorescencia terminal, un incremento significativo respecto a MT. Por el contrario, no mostró diferencias respecto a las líneas parentales *35S::CcGA20ox1* y *Dwarf*.

La única línea que tuvo reducido el número de hojas de forma significativa fue *dgt*, ya que desarrolló $6,4 \pm 0,1$ frente a las $7,4 \pm 0,1$ de MT.

entire presentó un incremento significativo del número de hojas respecto a MT, con $8,3 \pm 0,2$ hojas. Visualmente, las plantas de esta línea tienen aspecto redondeado, similar a MT.

1.4. Diámetro del entrenudo

En MT el diámetro del quinto entrenudo tuvo $5,7 \pm 0,1$ mm.

35S::CcGA20ox1 redujo significativamente el diámetro del entrenudo (14%).

procera y *Dwarf* fueron iguales a MT.

El híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* presentó un diámetro del entrenudo significativamente más estrecho que en MT y *Dwarf*, mientras que fue igual a *35S::CcGA20ox1*.

dgt desarrolló un entrenudo significativamente más estrecho que MT.

El diámetro del entrenudo en *entire* no mostró cambio significativo respecto a MT.

1.5. Efecto de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* sobre el fenotipo vegetativo de las líneas mutantes

Como se ve en las Tablas 7 y 8, la incorporación de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* en MT y sus mutantes (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *dgt*, *entire* y *Dwarf/35S::CcGA20ox1*), no alteró significativamente su fenotipo. Esto indica que los resultados de expresión de *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* en las líneas mutantes, que se describirán más adelante, no están afectadas por la presencia de los transgenes.

En la Fig. 21 se representan los datos de las características vegetativas de las líneas MT y de sus mutantes (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *dgt*, *entire* y *Dwarf/35S::CcGA20ox1*) sin transgén, indicando las diferencias significativas existentes entre las distintas líneas.

2. Caracterización reproductiva

En la Tabla 9 se dan los datos de los caracteres fenotípicos reproductivos de las líneas utilizadas en el trabajo. Las Figs 22 y 23 muestran la primera inflorescencia y las partes de una flor representativa de cada línea. Las comparaciones que se describen a continuación se llevaron a cabo entre MT y los distintos mutantes (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *Dwarf/35S::CcGA20ox1*, *dgt* y *entire*). Posteriormente se analizó el posible efecto de la introducción de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* sobre el fenotipo.

2.1. Número de flores en la inflorescencia terminal

Las inflorescencias de tomate poseen flores en distintos estados de desarrollo pudiéndose encontrar desde un botón floral a un fruto verde en desarrollo en el mismo racimo. La Fig. 22 muestra el conjunto de flores que componen la inflorescencia terminal de cada línea en el momento de anthesis de la flor con desarrollo más avanzado.

MT tuvo una media de 7 flores en la inflorescencia terminal. Se observó una disminución significativa del número de flores en el caso de *35S::CcGA20ox1* (20%), *procera* (32%), y *entire* (27%), respecto de MT.

Dwarf y *dgt* no presentaron un cambio significativo en el número de flores respecto a MT.

El híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* no difirió significativamente de MT en cuanto al número de flores de la inflorescencia terminal, ni tampoco del parental *35S::CcGA20ox1*. Pero sí mostró una disminución significativa (16%) respecto a *Dwarf*.

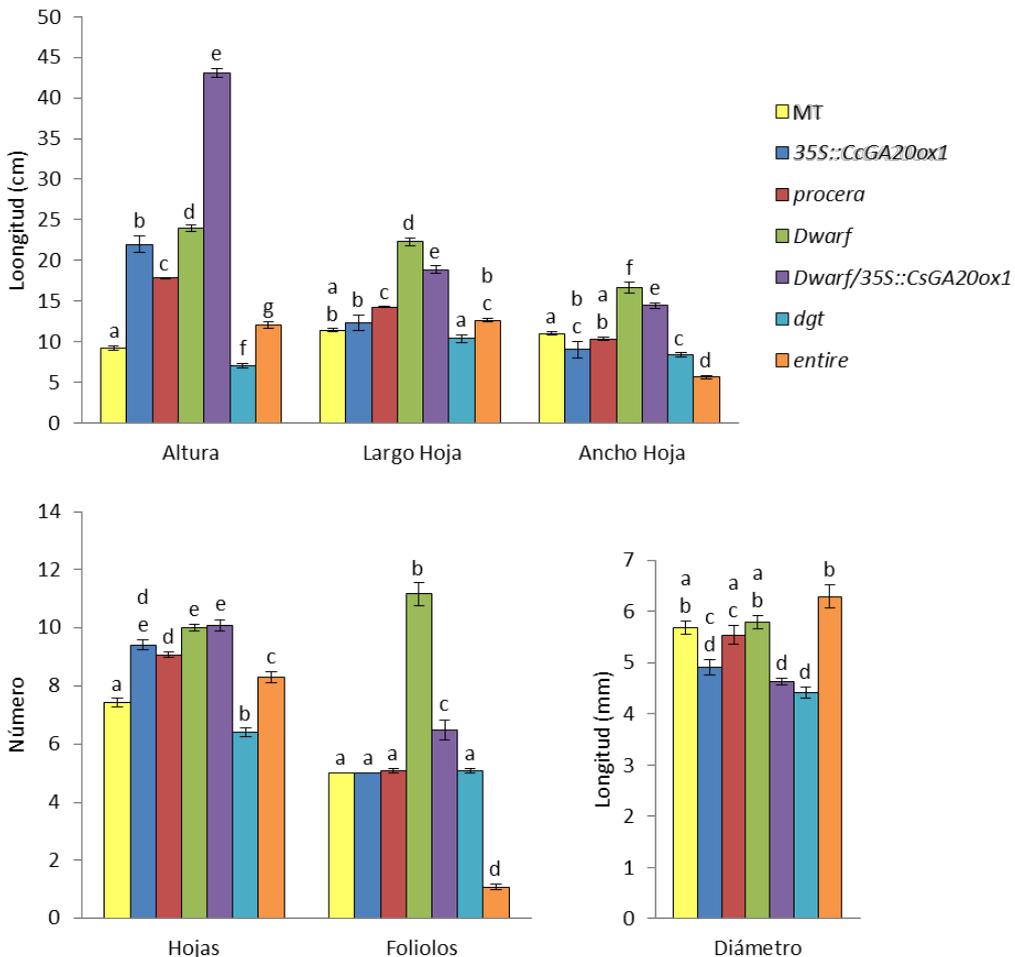


Fig. 21: Características fenotípicas vegetativas de las distintas líneas.

Los datos son medias de 12 plantas \pm SEM. Ver Tabla 7 y 8 para más detalles. Los datos marcados con distintas letras son significativamente diferentes entre ellos (mediante estudio estadístico ANOVA para $p < 0,05$).

2.2. Tiempo de floración

El inicio de la floración en MT ocurrió $31 \pm 0,4$ días tras la siembra en invernadero.

Las líneas *35S::CcGA20ox1* y *procera* florecieron significativamente más tarde que MT ($37,7 \pm 0,9$ y $36,7 \pm 0,9$ días, respectivamente).

Dwarf no presentó cambios significativos en el tiempo de floración.

Tabla 9: Características fenotípicas reproductivas de las distintas líneas utilizadas.

Los datos son valores medios de al menos 20 flores de 10 plantas \pm SEM. La incorporación de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* no produjo en ningún caso modificaciones significativas en las características fenotípicas de las plantas (mediante test t-student).

	Flores (n)	Antesis (día)	Sépalos (mm ²)	Pétalos (mm ²)	Cono (mm)	Pistilo (mm)	Pétalos (n)
MT	7,2 \pm 0,3	31 \pm 0,4	30,7 \pm 0,8	101,7 \pm 5,6	5,5 \pm 0,1	6,4 \pm 0,1	5,0 \pm 0,0
<i>pSIGA20ox1::GUS</i>	7,3 \pm 0,2	31,5 \pm 0,8	30,8 \pm 0,1	101 \pm 6,7	5,5 \pm 0,1	6,4 \pm 0,1	5,0 \pm 0,0
<i>DR5::GUS</i>	7,2 \pm 0,2	31,6 \pm 0,7	30,7 \pm 0,1	102 \pm 6,1	5,5 \pm 0,1	6,5 \pm 0,1	5,0 \pm 0,0
35S::CcGA20ox1	5,8 \pm 0,2	37,7 \pm 0,9	51,2 \pm 1,8	142,2 \pm 8,7	6,8 \pm 0,1	7,8 \pm 0,1	5,4 \pm 0,0
<i>35:CsGA20ox1/pSIGA20ox1::GUS</i>	5,9 \pm 0,2	37,3 \pm 0,7	50,7 \pm 1,6	141,6 \pm 7,8	6,8 \pm 0,1	7,8 \pm 0,1	5,5 \pm 0,0
procera	4,9 \pm 0,2	36,7 \pm 0,9	49,3 \pm 1,6	149,4 \pm 8,8	6,7 \pm 0,1	8,8 \pm 0,1	6,0 \pm 0,1
<i>procera/pSIGA20ox1::GUS</i>	4,6 \pm 0,2	37,2 \pm 0,9	49,1 \pm 1,5	150,1 \pm 8,7	6,6 \pm 0,1	8,8 \pm 0,1	5,9 \pm 0,0
Dwarf	7,8 \pm 0,2	29,8 \pm 0,5	54,0 \pm 3,2	198,2 \pm 7,9	7,4 \pm 0,1	8,7 \pm 0,1	5,3 \pm 0,0
<i>Dwarf/pSIGA20ox1::GUS</i>	7,6 \pm 0,2	30,2 \pm 0,6	58,9 \pm 1,9	197,9 \pm 6,0	7,3 \pm 0,1	8,8 \pm 0,1	5,3 \pm 0,0
<i>Dwarf/DR5::GUS</i>	7,7 \pm 0,3	30,1 \pm 0,5	56,6 \pm 2,8	196,5 \pm 6,5	7,3 \pm 0,1	8,7 \pm 0,1	5,3 \pm 0,0
Dwarf/35S::CcGA20ox1	6,5 \pm 0,3	35,2 \pm 0,7	71,6 \pm 2,4	260 \pm 12,5	8,1 \pm 0,1	9,3 \pm 0,1	5,2 \pm 0,0
<i>Dwarf/35:CsGA20ox1/pSIGA20ox1::GUS</i>	6,4 \pm 0,3	34,8 \pm 0,7	71,1 \pm 2,2	260,2 \pm 12,8	8,1 \pm 0,1	9,2 \pm 0,1	5,2 \pm 0,0
dgt	6,3 \pm 0,2	37,2 \pm 0,9	34,0 \pm 1,1	105,2 \pm 4,2	6,0 \pm 0,1	6,9 \pm 0,1	5,0 \pm 0,0
<i>dgt/pSIGA20ox1::GUS</i>	6,0 \pm 0,2	36,7 \pm 0,8	33,8 \pm 1	104,7 \pm 4,1	5,9 \pm 0,1	6,9 \pm 0,1	5,0 \pm 0,0
entire	5,2 \pm 0,4	35,4 \pm 1,1	43,1 \pm 2,2	92,8 \pm 4,3	6,2 \pm 0,1	7,1 \pm 0,1	5,5 \pm 0,0
<i>entire/pSIGA20ox1::GUS</i>	5,4 \pm 0,4	34,3 \pm 0,9	42,8 \pm 2,2	92,1 \pm 4,2	6,2 \pm 0,1	7,1 \pm 0,1	5,5 \pm 0,0
<i>entire/DR5::GUS</i>	5,2 \pm 0,4	34,5 \pm 1,1	43,2 \pm 2,2	92,6 \pm 4,1	6,1 \pm 0,1	7,1 \pm 0,1	5,5 \pm 0,0

El híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* mostró un retraso significativo de la floración respecto de MT ($31 \pm 0,4$ vs $35,2 \pm 0,7$) y del parental *Dwarf* ($29,8 \pm 0,5$ vs $35,2 \pm 0,7$), pero no respecto del parental *35S::CcGA20ox1*.

dgt inició la floración significativamente más tarde que MT ($37,2 \pm 0,9$ vs $31 \pm 0,4$).

entire mostró un retraso significativo en la floración respecto a MT ($35,4 \pm 0,9$ vs $31 \pm 0,4$).

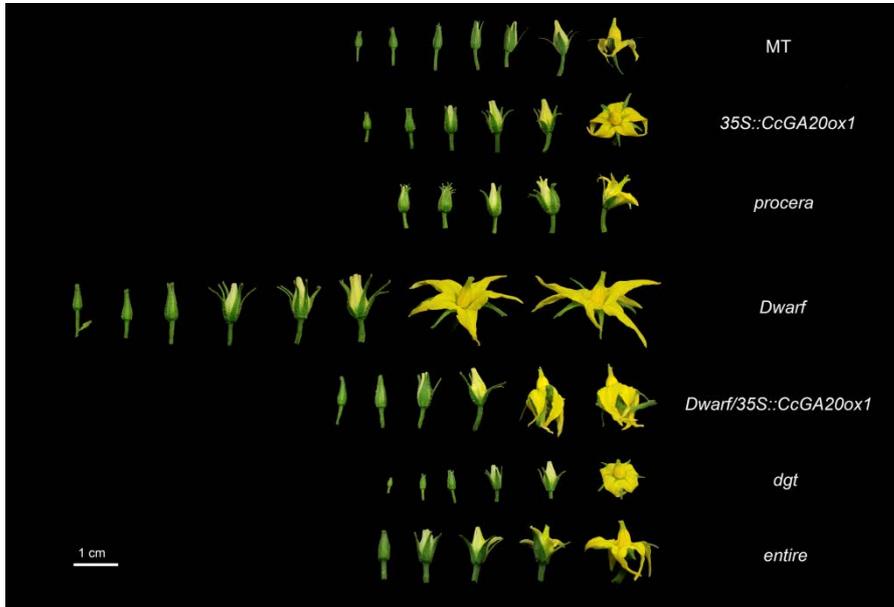


Fig. 22: Flores presentes en la inflorescencia terminal en distintos estados de desarrollo. Foto tomada en el momento de que la flor de desarrollo más avanzado está completamente abierta. Obsérvese el mayor número de flores y su mayor tamaño en el caso de *Dwarf*.

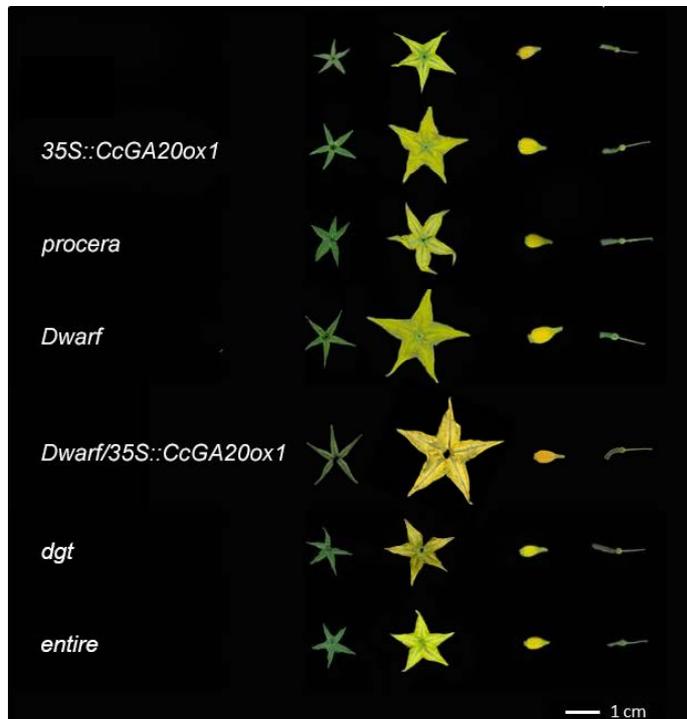


Fig. 23: Flores representativas completamente desarrolladas de las líneas estudiadas. Obsérvese el mayor tamaño de las flores en el caso de las líneas portadoras del gen *Dwarf*.

2.3. Área de los sépalos

MT tuvo un área de los sépalos de $30,7 \pm 0,8 \text{ mm}^2$.

Las líneas *35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf* y *entire* presentaron un aumento significativo (entre el 40 y el 75%) del área de los sépalos respecto a MT.

El híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* presentó el doble de área de los sépalos que MT y fue significativamente mayor a todas las líneas del estudio.

dgt fue significativamente igual que MT respecto al área de los sépalos.

2.4. Área de los pétalos

Los pétalos de MT tuvieron de media un área de $101,7 \pm 5,6 \text{ mm}^2$.

Las flores de *35S::CcGA20ox1* y *procera* desarrollaron pétalos significativamente mayores a MT (39,8% y 46,9% respectivamente).

Dwarf mostró flores con pétalos de gran tamaño, incrementando significativamente el área respecto a MT ($101,7 \pm 5,6$ vs $198 \pm 7,9$).

El área de los pétalos del híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* fueron significativamente mayores que los de MT y el resto de las líneas del estudio.

Los pétalos de las flores *dgt* y *entire* fueron iguales respecto a MT.

Para conocer si la proporción de la flor, respecto a MT, está afectada en las líneas en estudio, se calculó la relación entre el área de los pétalos y la de los sépalos. El resultado mostró que sólo en *entire* dicha relación fue significativamente menor que en MT.

2.5. Longitud del cono estaminal

Se observó que todos los mutantes estudiados presentaban una longitud del cono estaminal significativamente mayor a MT.

Las líneas *35S::CcGA20ox1* y *procera* tuvieron una longitud del cono estaminal similar entre ellas y un 22,7% y 21,6%, respectivamente, más largo que MT.

El cono estaminal de las flores de *Dwarf*, fue significativamente más largo que el de MT (34,5%) y también respecto a *35S::CcGA20ox1* y *procera*.

El híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* mostró una longitud del cono estaminal significativamente mayor respecto a todas las líneas en estudio (47,7% más largo que MT).

dgt y *entire* desarrollaron conos estaminales iguales, pero significativamente más largos respecto a MT (8,6% y 12,7% respectivamente).

2.6. Longitud pistilo

MT desarrolló un pistilo de longitud media de $6,4 \pm 0,1$ mm y fue significativamente más corto respecto a las demás líneas.

En *35S::CcGA20ox1* la longitud aumentó un 20,4% respecto a MT.

procera y *Dwarf* presentaron un pistilo significativamente más largo que MT (21,6% y 35,4%, respectivamente).

El híbrido mostró una longitud de pistilo significativamente más largo que las demás líneas.

En *dgt* y *entire* la longitud media del pistilo aumentó significativamente respecto a MT (8,6 % y 12,7%, respectivamente).

El éxito de la autopolinización está condicionado por la longitud del pistilo y del cono estaminal. Con objeto de observar si la relación existente entre ambos órganos florales es afectada por los genes, se calculó la relación entre la longitud del pistilo y la del cono estaminal. El mutante *procera* destacó por presentar una relación significativamente mayor que MT, debido a que presenta un pistilo más alargado y no de un cono estaminal acortado.

2.7. Número de pétalos

Como se ve en las Tablas 9 y 10, y en las Figs 23 y 24, la flor de tomate posee normalmente 5 pétalos, pero en ocasiones este número puede aumentar hasta alcanzar los 8 pétalos. En primer lugar se analizaron las posibles diferencias fenotípicas debidas a las mutaciones y luego se analizó el posible efecto del transgén.

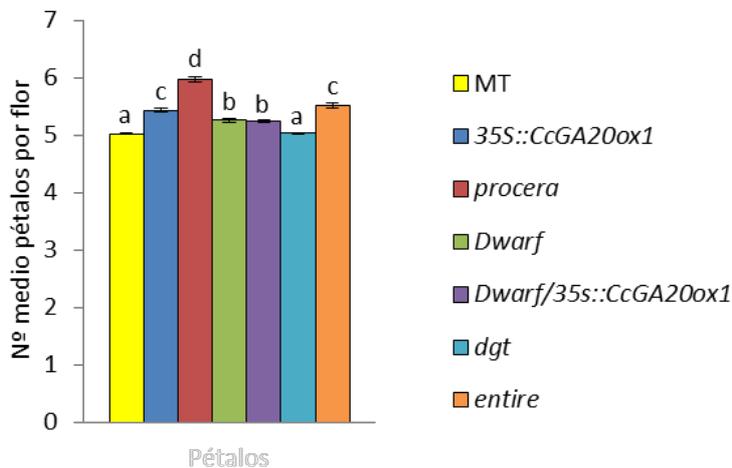


Fig. 24: Media del número de pétalos de la flor.

Datos correspondientes a 10 flores de las 2 primeras inflorescencias de 10 plantas. Los datos son la media \pm SEM del número de pétalos de las flores. Los datos marcados con distintas letras son significativamente diferentes entre ellos (mediante estudio estadístico ANOVA para $p < 0,05$).

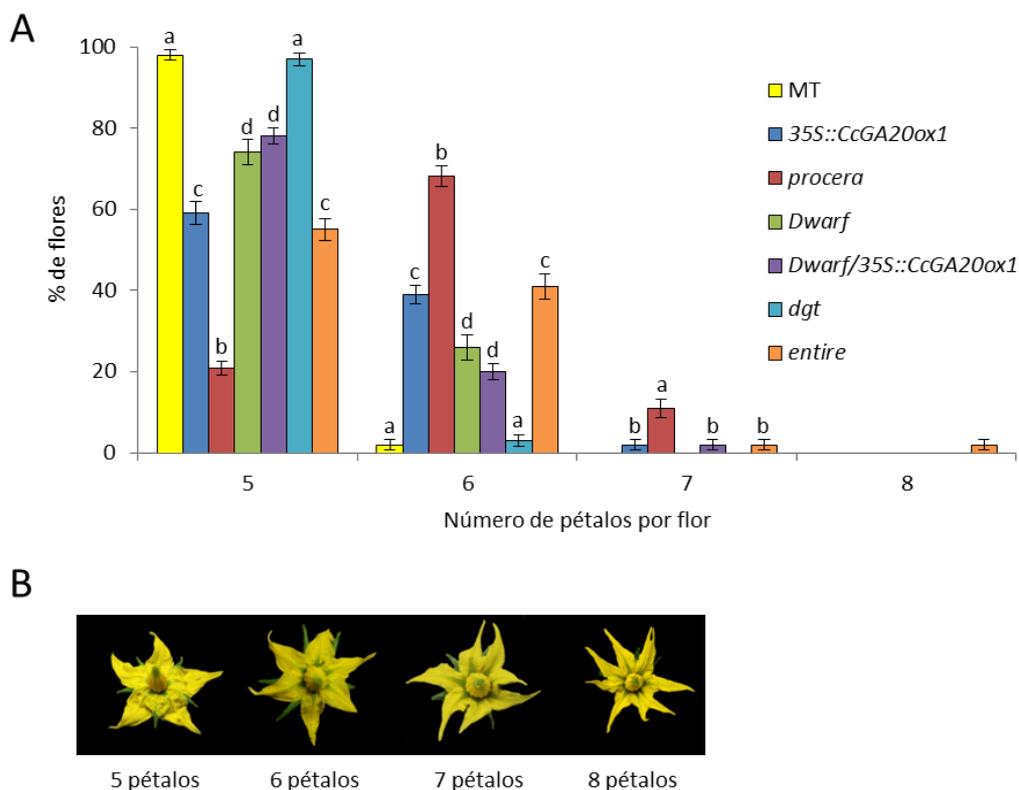


Fig. 25: Porcentaje de flores con distinto número de pétalos.

A) Datos correspondientes a 10 flores de las 2 primeras inflorescencias de 10 plantas. Los datos son la media \pm SEM del porcentaje de flores de cada categoría respecto del total de flores. Los datos marcados con distintas letras son significativamente diferentes entre ellos (mediante estudio estadístico ANOVA para $p < 0,05$). B) Flores representativas de cada tipo de flor con distinto número de pétalos.

Las flores de MT poseen una media de $5,0 \pm 0,0$ pétalos por flor, valor tipo de las flores de tomate. Las mutaciones *sp*, *dwarf* y *ilr* no alteran dicha característica floral.

35S::CcGA20ox1 mostró un aumento significativo del número medio de pétalos de la flor respecto a MT.

procera presentó de media flores con $6,0 \pm 0,1$ pétalos.

En la línea *Dwarf* hubo un aumento del número de pétalos de forma significativa ($5,3 \pm 0,0$ vs. $5,0 \pm 0,0$).

El híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* desarrolló significativamente más pétalos de media por flor que MT y *35S::CcGA20ox1*, pero no se diferenció de *Dwarf*.

El número de pétalos en flores de *dgt* no varió, mientras que en *entire* aumentó significativamente.

Hemos visto que las medias del número de pétalos por flor están comprendidas entre 5 y 6. Por ello se contabilizó la frecuencia con la que aparecían flores penta, sexta, hepta y octopétalas en las diferentes líneas.

En la Tabla 10 y Fig. 24 se dan los distintos porcentajes de flores con distinto número de pétalos en todas las líneas estudiadas. En primer lugar se comparó las mutaciones respecto MT y luego se analizó el posible efecto del transgén.

Tabla 10: Porcentaje de flores con distinto número de pétalos.

Datos correspondientes a 10 flores de las 2 primeras inflorescencias de 10 plantas. Los datos son medias \pm SEM del porcentaje de flores de cada categoría respecto del total de flores.

	Número de pétalos			
	5	6	7	8
MT	98,0 \pm 1,3	2,0 \pm 1,3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>pSIGA20ox1::GUS</i>	97,0 \pm 1,5	3,0 \pm 1,5	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>DR5::GUS</i>	97,0 \pm 1,5	3,0 \pm 1,5	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
35S::CcGA20ox1	59,0 \pm 2,8	39,0 \pm 2,3	2,0 \pm 1,3	0,0 \pm 0,0
<i>35::CsGA20ox1/pSIGA20ox1::GUS</i>	57,0 \pm 3,0	41,0 \pm 3,1	2,0 \pm 1,3	0,0 \pm 0,0
procera	20,9 \pm 1,7	68,1 \pm 2,6	10,9 \pm 2,3	0,0 \pm 0,0
<i>procera/pSIGA20ox1::GUS</i>	22,0 \pm 2,0	66,0 \pm 3,1	12,0 \pm 2,9	0,0 \pm 0,0
Dwarf	74,0 \pm 3,1	26,0 \pm 3,1	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Dwarf/pSIGA20ox1::GUS</i>	73,0 \pm 4,0	27,0 \pm 4,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>Dwarf/DR5::GUS</i>	74,0 \pm 3,1	26,0 \pm 3,1	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Dwarf/35S::CcGA20ox1	78,0 \pm 2,0	20,0 \pm 2,1	2,0 \pm 1,3	0,0 \pm 0,0
<i>Dwarf/35::CsGA20ox1/pSIGA20ox1::GUS</i>	76,0 \pm 3,1	22,0 \pm 2,5	2,0 \pm 1,3	0,0 \pm 0,0
dgt	97,0 \pm 1,5	3,0 \pm 1,5	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>dgt/pSIGA20ox1::GUS</i>	98,0 \pm 1,3	2,0 \pm 1,3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
entire	55,0 \pm 2,7	41,0 \pm 3,1	2,0 \pm 1,3	2,0 \pm 1,3
<i>entire/pSIGA20ox1::GUS</i>	53,0 \pm 3,3	42,0 \pm 3,3	3,0 \pm 1,5	2,0 \pm 1,3
<i>entire/DR5::GUS</i>	53,0 \pm 3,3	42,0 \pm 3,3	3,0 \pm 1,5	2,0 \pm 1,3

El 98% de las flores de MT presentó 5 pétalos y sólo el 2% restante presentó 6 pétalos (lo que justifica el valor medio de 5,0 \pm 0,0).

La mayoría de las flores de *35S::CcGA20ox1* tuvo 5 pétalos, pero con una frecuencia significativamente menor que MT, mientras que las flores con 6 y 7 pétalos fueron más abundantes que en MT.

procera desarrolló flores con 5 pétalos en un porcentaje cuatro veces menor que MT. El 68,1 \pm 2,6% de las flores tuvo 6 pétalos y el 10,9 \pm 2,3% presentó 7, frente al 2,0 \pm 1,3% y 0%, respectivamente, de MT

La flor más frecuente en *Dwarf* presentó 5 pétalos, al igual que en MT, pero en número menor. En la línea *Dwarf* se encontraron un 26,0 \pm 3,1% de flores con 6 pétalos.

El híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* desarrolló flores de 5, 6 y 7 pétalos, siendo las de 5 pétalos las más frecuentes, pero en menor número que MT. Las flores con 6 pétalos fueron significativamente más frecuentes que en MT.

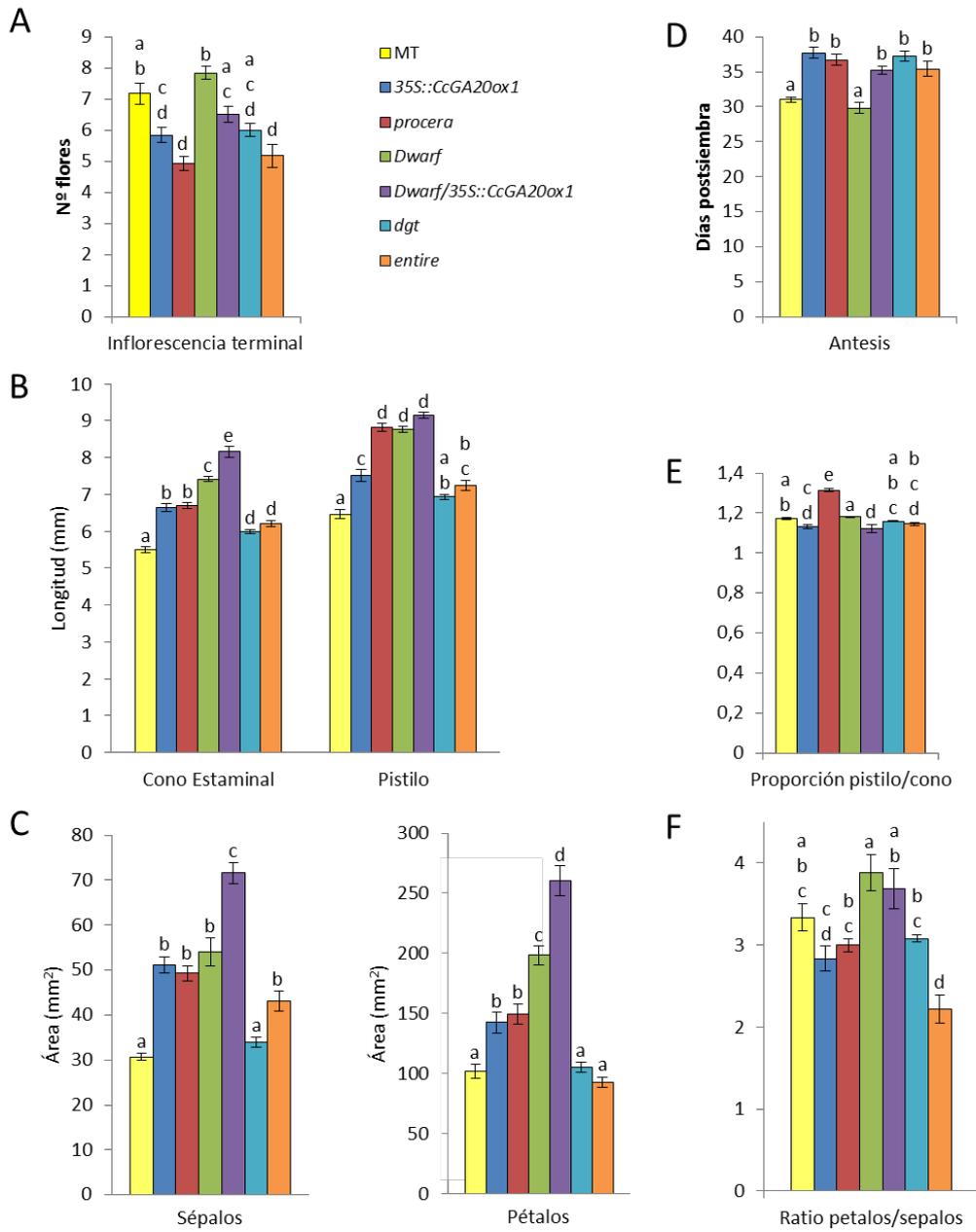
dgt no presentó cambios significativos en la frecuencia del número de pétalos de las flores respecto a MT.

entire mostró una disminución significativa de la frecuencia de flores de 5 pétalos respecto a MT. Las flores con 6 pétalos fueron significativamente más abundantes en *entire* que en MT. El porcentaje en que aparecen flores con 7 pétalos en *entire* fue $2,0 \pm 1,3\%$. También desarrolló flores con 8 pétalos a diferencia del resto de las líneas en estudio, en las que no se encontró ninguna flor con 8 pétalos.

2.8.Efecto de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* sobre el fenotipo reproductivo de las líneas mutantes

Como se ve en las Tablas 9 y 10, la incorporación de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* en MT y sus mutantes (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *dgt*, *entire* y *Dwarf/35S::CcGA20ox1*), no alteró significativamente su fenotipo. Esto indica que los resultados de expresión de *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* en las líneas mutantes, que se describirán más adelante, no están afectadas por la presencia de los transgenes.

En la Fig. 26 se representan los datos de las características reproductivas de las líneas MT y de sus mutantes (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *dgt*, *entire* y *Dwarf/35S::CcGA20ox1*) sin transgén, indicando las diferencias significativas existentes entre las distintas líneas.



2.9. Porcentaje de partenocarpia

Para determinar la capacidad partenocárpica de las líneas se realizaron dos ensayos complementarios. Uno de los ensayos se llevó a cabo con plantas cuyo crecimiento y desarrollo no se vio alterado por la manipulación de las flores. En el otro se dejaron 2 flores en cada una de las 4 primeras inflorescencias, que se emascularon. El objetivo era determinar si la manipulación de los racimos y la posterior emasculación de las flores podrían alterar la capacidad partenocárpica de las líneas. En ambos casos se recolectaron los frutos en estado rojo maduro.

En las Tablas 11 y 12 se dan los distintos porcentajes de frutos partenocárpicos de las líneas estudiadas. En la Fig. 27 se muestra la morfología y tamaño de frutos representativos de las líneas en estudio.

Tabla 11: Porcentaje de partenocarpia natural.

Plantas cultivadas en condiciones normales de invernadero correspondientes a las 2 primeras inflorescencias. Los datos son medias de 10 frutos de 12 plantas \pm SEM. Los datos marcados con distintas letras son significativamente diferentes entre ellos (mediante estudio estadístico ANOVA para $p < 0,05$).

	% Partenocarpia	
MT	10,0 \pm 2,9	a
35S::CcGA20ox1	27,8 \pm 2,1	b
procera	99,0 \pm 0,1	c
Dwarf	15,6 \pm 2,9	a,b
Dwarf/35S::CcGA20ox1	75,3 \pm 2,0	d
dgt	9,4 \pm 2,3	a
entire	20,9 \pm 3,4	a,b

Tabla 12: Porcentaje de frutos partenocárpicos tras emasculación.

Se dejaron 2 flores por inflorescencia que se emascularon. Los datos son medias de 8 ovarios por planta \pm SEM. Los datos marcados con distintas letras son significativamente diferentes entre ellos (mediante estudio estadístico ANOVA para $p < 0,05$).

	% Partenocarpia	
MT	5,2 \pm 2,4	a
35S::CcGA20ox1	21,9 \pm 3,1	b
procera	90,6 \pm 3,8	d
Dwarf	10,4 \pm 3	a,b
Dwarf/35S::CcGA20ox1	70 \pm 4,5	c
dgt	9,4 \pm 2,7	a,b
entire	18,8 \pm 3,6	a,b

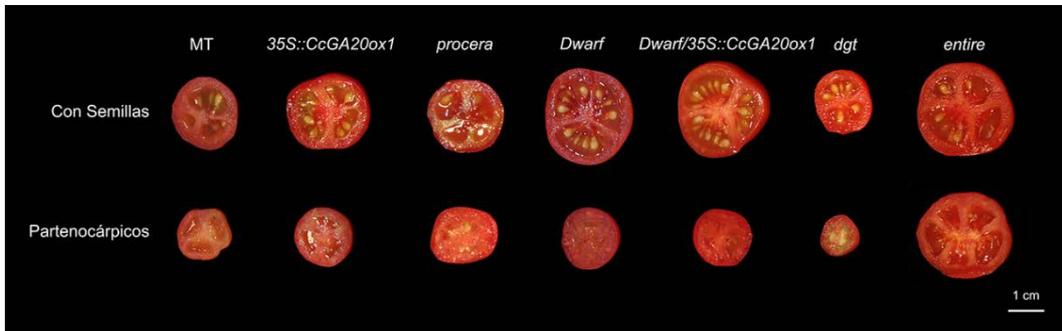


Fig. 27: Frutos representativos con semillas y sin semillas (partenocárpicos) de las líneas utilizadas.
Se observa un menor tamaño de los frutos partenocárpicos en todos los casos.

2.9.1. Ensayo de partenocarpia en plantas con flores no manipuladas (partenocarpia natural).

La capacidad partenocárpica natural de MT fue de un 10%, y no se vio afectada significativamente en los fondos mutantes *dgt* o *entire*.

35S::CsGA20ox1 triplicó su capacidad partenocárpica respecto a MT.

El porcentaje de partenocarpia aumentó drásticamente en *procera* hasta el 99%.

La presencia de BR en *Dwarf* no alteró la partenocarpia de forma significativa,

En el híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* la partenocarpia fue del 75%.

2.9.2. Ensayo de partenocarpia en plantas con flores emasculadas (partenocarpia inducida)

En este estudio las flores se emascularon 2 días antes de la antesis para evitar la autopolinización.

La débil capacidad partenocárpica natural de MT se redujo significativamente tras emasculación de las flores (10% vs 5,2%).

35S::CcGA20ox1 tuvo una partenocarpia cuatro veces mayor que MT (21,9% vs 5,2%).

La capacidad partenocárpica inducida de *procera* disminuyó significativamente tras la emasculación. Pero mostró el mayor porcentaje de frutos partenocárpicos de todas las líneas estudiadas.

En los genotipos *Dwarf*, *dgt* y *entire* la partenocarpia fue igual que en MT.

El híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* desarrolló un número significativamente mayor de frutos partenocárpicos respecto de MT, *Dwarf* y *35S::CcGA20ox1* (5,2%, 10,4% 21,9%, respectivamente).

3. Fenotipo de ramificación

Con objeto de determinar si la ramificación está afectada en las líneas mutantes utilizadas en este trabajo, se cuantificó el porcentaje de brotes axilares desarrollados. Los primeros datos de ramificación se tomaron a la quinta semana de la siembra en invernadero (momento en que MT empieza a florecer), y los últimos a las nueve semanas, (momento en el que MT ya ha desarrollado todos los brotes laterales). La longitud mínima considerada para contabilizar que una yema había iniciado su desarrollo fue de 0,5 cm.

Los datos se tomaron por planta y posición de la yema, con objeto de determinar la tasa de ramificación y el efecto de posición de la yema. Se considera tasa de ramificación el porcentaje de brotes desarrollados en el tallo principal de la planta, respecto al número total de yemas axilares existentes.

En la Tabla 13 y Fig. 28 se muestran los datos de tasa de ramificación de las líneas analizadas en el trabajo. Las comparaciones que se describen a continuación se llevaron a cabo entre MT y los distintos mutantes (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *Dwarf/35S::CcGA20ox1*, *dgt* y *entire*). Posteriormente se analizó el posible efecto de la introducción de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* sobre el fenotipo.

Tabla 13: Tasa de ramificación.

Porcentaje de brotes desarrollados en el tallo principal de la planta, respecto al número total de yemas axilares existentes. Los datos son medias de 10 plantas \pm SEM del porcentaje de yemas brotadas con longitud $>0,5$ cm, respecto al número total de axilas de la planta.

	Nº total de yemas axilares brotadas (%)				
	Nº semanas				
	5	6	7	8	9
MT	2,5 \pm 2,5	62,5 \pm 12,2	86,9 \pm 5,4	95,0 \pm 3,3	100,0 \pm 0,0
<i>pSIGA20ox1::GUS</i>	2,3 \pm 2,1	60,8 \pm 11,4	88,4 \pm 4,9	96,8 \pm 3,2	100,0 \pm 0,0
<i>DR5::GUS</i>	2,5 \pm 2,4	64,1 \pm 14,0	87,9 \pm 5,5	97,5 \pm 3,5	100,0 \pm 0,0
35S::CcGA20ox1	0,0 \pm 0,0	7,8 \pm 2,3	12,7 \pm 0,2	19,0 \pm 4,7	36,6 \pm 5,1
<i>35S::CcGA20ox1/pSIGA20ox1</i>	0,0 \pm 0,0	8,2 \pm 2,2	13,3 \pm 0,7	21,5 \pm 3,6	38,7 \pm 3,7
procera	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	8,9 \pm 2,0	17,9 \pm 2,2	24,1 \pm 3,5
<i>procera/pSIGA20ox1::GUS</i>	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	10,3 \pm 2,5	16,1 \pm 1,8	22,7 \pm 2,7
Dwarf	47,7 \pm 3,5	92,0 \pm 2,3	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
<i>Dwarf/pSIGA20ox1::GUS</i>	46,0 \pm 4,1	93,5 \pm 2,6	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
<i>Dwarf/DR5::GUS</i>	48,1 \pm 3,9	91,9 \pm 1,9	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
Dwarf/35S::CcGA20ox1	7,1 \pm 1,9	13,1 \pm 1,3	24,7 \pm 3,2	37,9 \pm 6,1	49,2 \pm 4,3
<i>Dwarf/35S::CcGA20ox1/pSIGA20ox1::GUS</i>	8,2 \pm 2,3	14,1 \pm 1,3	22,8 \pm 3,3	38,6 \pm 7,2	51,7 \pm 5,1
dgt	2,4 \pm 1,7	9,6 \pm 2,9	24,7 \pm 3,4	37,8 \pm 4,1	54,2 \pm 6,4
<i>dgt/pSIGA20ox1::GUS</i>	3,2 \pm 2,1	10,4 \pm 2,3	22,8 \pm 4,3	36,8 \pm 3,8	55,2 \pm 6,1
entire	13,9 \pm 3,7	47,5 \pm 5,5	80,0 \pm 6,8	88,6 \pm 4,2	92,9 \pm 3,5
<i>entire/pSIGA20ox1::GUS</i>	14,7 \pm 5,8	48,3 \pm 6,7	78,9 \pm 4,1	93,7 \pm 2,8	93,7 \pm 2,8
<i>entire/DR5::GUS</i>	13,7 \pm 7,2	53,3 \pm 10,3	81,3 \pm 5,8	93,8 \pm 2,1	97,1 \pm 2,4

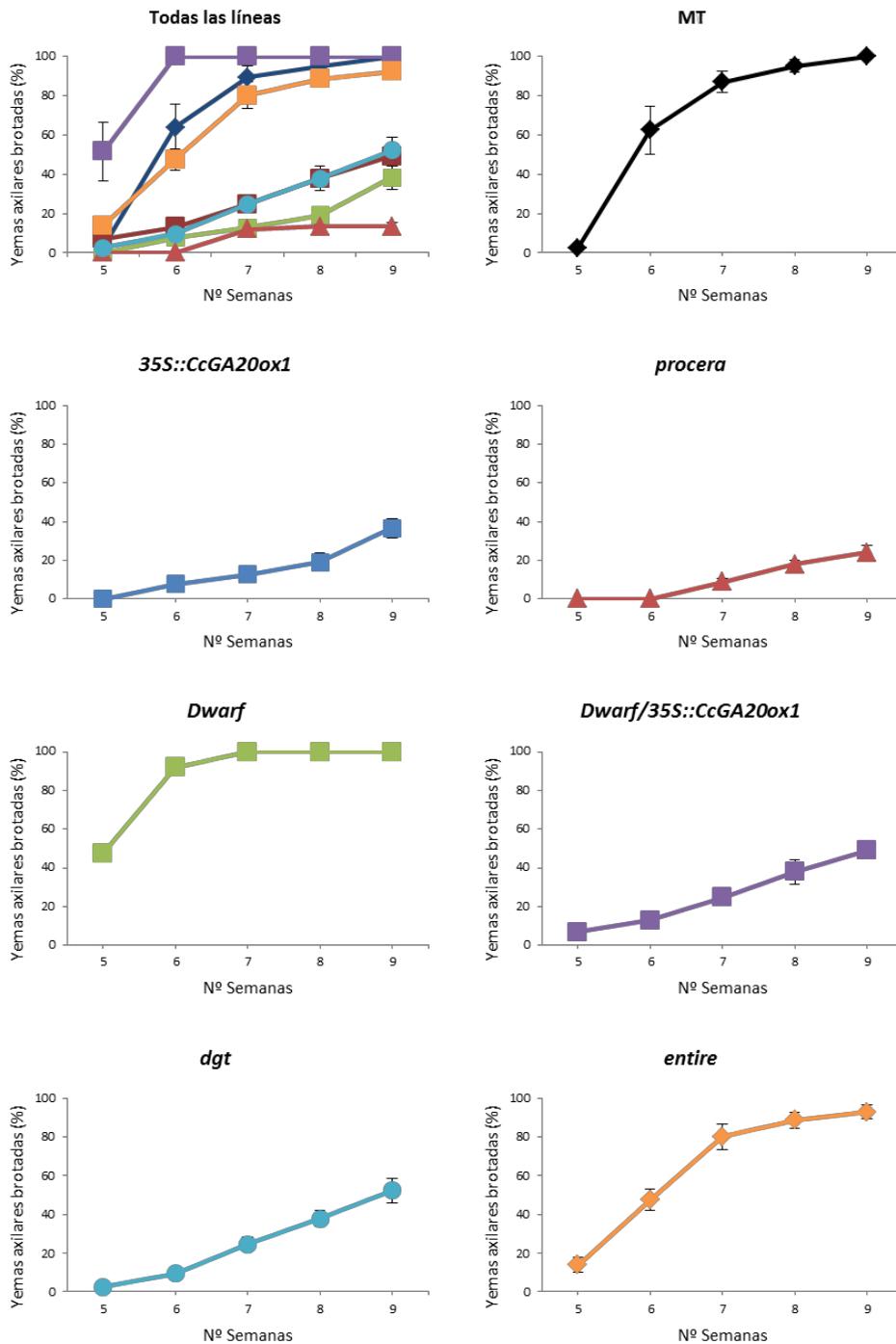


Fig. 28: Tasa de ramificación.

Porcentaje de brotes axilares desarrollados en el tallo principal de la planta respecto al número total de axilas existentes en el tallo principal. Los datos son la media de 10 plantas \pm SEM del porcentaje de brotes desarrollados mayores de 0,5 cm respecto al número total de brotes de la planta.

3.1. Tasa de ramificación

En el momento de la floración MT prácticamente no ha desarrollado brotes axilares inferiores. La aparición de brotes axilares tras la floración fue rápida, superando el 50% en la sexta semana tras la siembra y el 80% en la séptima semana.

La ramificación en *35S::CcGA20ox1* se retrasó por lo menos una semana respecto a MT. También la aparición de nuevos brotes fue más lenta, lo que explica que a la novena semana sólo se hubiesen desarrollado el 37% de las yemas laterales.

En *procera*, los primeros brotes se observaron al menos dos semanas más tarde que en MT. El desarrollo de las yemas axilares fue escaso, de modo que al finalizar la novena semana menos del 25% de las yemas se habían desarrollado.

Dwarf presentó casi el 50% de las yemas axilares desarrolladas a la quinta semana, frente al 2,5% en MT. A la séptima semana se habían desarrollado el 100% de las yemas axilares, dos semanas antes que en MT, que alcanzó 100% a la novena semana.

En el híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* se observó a la quinta semana postsiembra una tasa de ramificación del 7,1% frente al 2,5% de MT. A la novena semana el híbrido no alcanzó el 50% de brotes axilares desarrollados mientras que MT y *Dwarf* alcanzaron el 100%. La tasa de ramificación final del híbrido se adelantó una semana y fue mayor respecto a *35S::CcGA20ox1*.

dgt mostró a la quinta semana una tasa de ramificación similar a la de MT (2,4% vs 2,5%). Sin embargo, sólo el 54% de los brotes axilares estaban brotados a la novena semana.

La tasa de ramificación observada en el mutante *entire* fue mayor que en MT a la quinta semana postsiembra (13,4% vs 2,5%). Sin embargo, MT alcanzó el 100% de brotes axilares desarrollados a la novena semana post siembra, mientras que *entire* desarrolló el 93,5% de los brotes.

3.2. Ramificación por posición de la yema axilar

La tasa de ramificación proporciona un dato muy valioso para conocer el potencial de ramificación de una línea. Pero no da información sobre si todos los brotes se desarrollan al mismo tiempo o si existe un efecto de posición de la yema en la planta sobre la ramificación.

En la Fig. 29 se representan los datos de la ramificación por posición de la axila de las líneas utilizadas en el trabajo. Las comparaciones que se describen a continuación se llevaron a cabo entre MT y los distintos mutantes (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *Dwarf/35S::CcGA20ox1*, *dgt* y *entire*). Posteriormente se analizó el posible efecto de la introducción de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* sobre el fenotipo.

En MT se desarrollaron todos los brotes de la planta, aunque a distinto tiempo. Se observó que los brotes inferiores 1 y 2 se desarrollaron más tarde que los brotes 3, 4 y 5.

Las tres yemas superiores brotaron a la séptima semana, y la yema 1 dos semanas más tarde.

En *35S::CcGA20ox1* el brote superior (yema 8) se desarrolló rápidamente, a un ritmo comparable al de los brotes superiores de MT (yemas 4 y 5). El brote 7 se retrasó una semana y su desarrollo fue más lento, y a la novena semana alcanzó el 87,5%. Los brotes 5 y 6 se desarrollaron a la séptima semana y alcanzaron el 62,5% a la novena. El brote 4 sólo se desarrolló el 12,5% a la novena semana y los brotes 1, 2 y 3 no se desarrollaron.

En *procera* sólo los brotes superiores (yemas 6, 7 y 8) se habían desarrollado a las nueve semanas de estudio, y sólo el brote superior alcanzó el 100%. El brote 7 inició su desarrollo a la séptima semana y a la novena la tasa de ramificación fue del 60%. El brote 6 sólo se desarrolló en un 40% de las plantas a la novena semana.

En *Dwarf* se adelantó la ramificación respecto a MT y también se desarrollaron todos los brotes laterales. El desarrollo fue escalado y los brotes inferiores (1 y 2) fueron los últimos en iniciar su desarrollo, al igual que MT.

Dwarf/35S::CcGA20ox1, desarrolló el brote superior (axila 9) un 60% a la quinta semana postsiembra y alcanzó el 100% una semana después. La axila 8 llegó al 100% a la octava semana. Los brotes de las axilas 7 y 6 se desarrollaron en un 90% y 80%, respectivamente, a la novena semana. El brote 5 se desarrolló a la octava semana y en la novena alcanzó el 60%. Los brotes 3 y 4 aparecieron en la octava y novena semana en un porcentaje del 10 y 20%, respectivamente. Los brotes 1 y 2 no se desarrollaron.

En *dgt* sólo se desarrolló el 100% de los brotes axilares de la axila superior (axila 5). El 93,3% los brotes de la axila 4 se habían desarrollado a la novena semana. El desarrollo de los brotes 1, 2 y 3 se retrasó al menos una semana y con una ramificación menor a la novena semana que MT.

En *entire* todos los brotes axilares estaban presentes entre la quinta y sexta semana postsiembra. Los brotes axilares correspondientes a las axilas 1, 3, 6 y 7 se desarrollaron en el 100% de los casos, mientras que los brotes 2 y 5 alcanzaron el 90% y el 4 no superó el 70% de desarrollo a la novena semana.

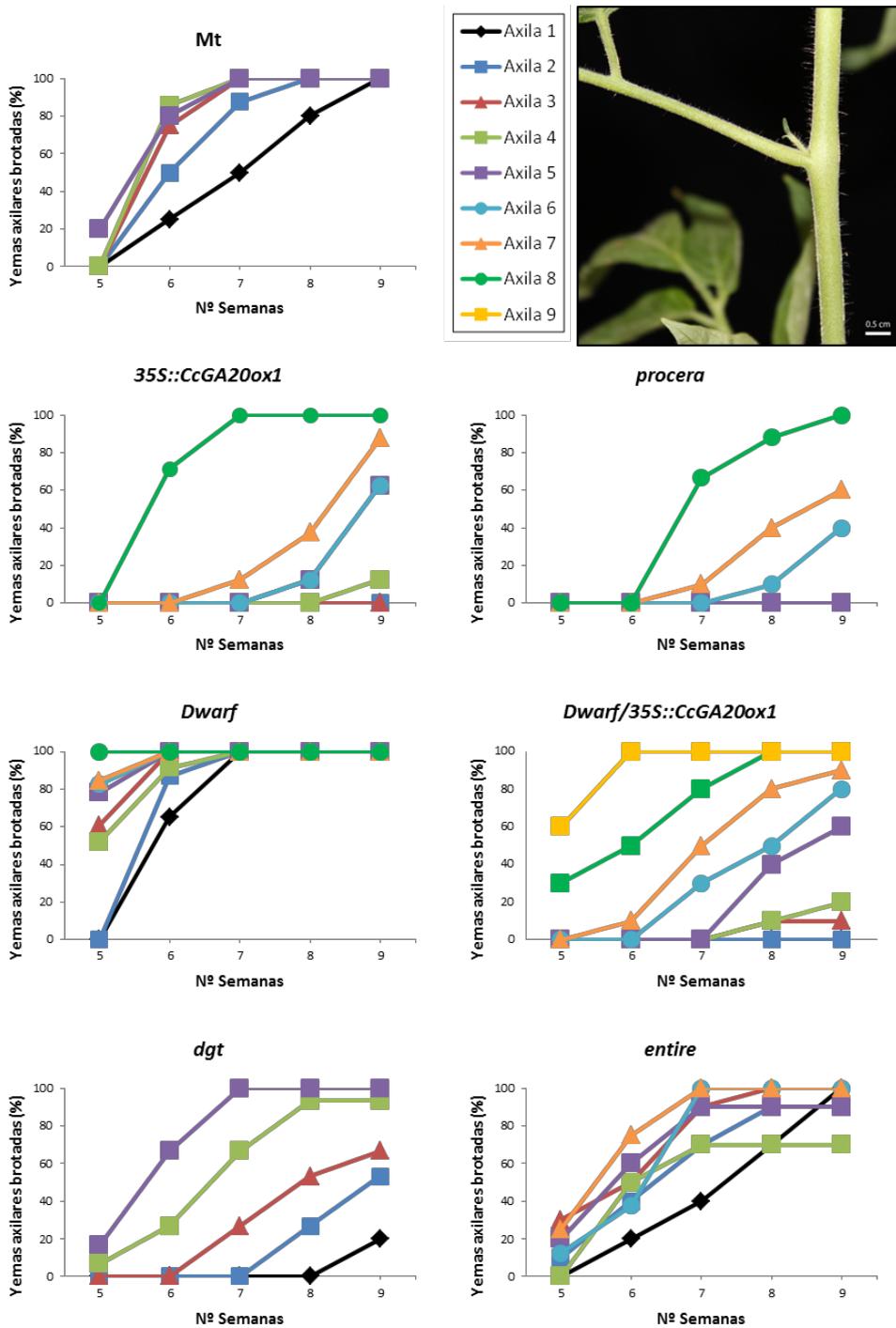


Fig. 29: Porcentaje de yemas axilares en la misma posición brotadas a lo largo del tiempo.
 Los datos son el porcentaje de yemas en la misma posición brotadas con una longitud >0,5 cm respecto al número total de yemas de dicha posición presentes en 10 plantas por línea.

3.3. Efecto de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* sobre la ramificación de las líneas mutantes

Como se ve en la Tabla 13, la incorporación de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* en MT y sus mutantes (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *dgt*, *entire* y *Dwarf/35S::CcGA20ox1*), no alteró significativamente su fenotipo. Esto indica que los resultados de expresión de *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* en las líneas mutantes, que se describirán más adelante, no están afectadas por la presencia de los transgenes.

3.4. Longitud final de los brotes laterales

A los 90 días de la siembra se procedió a la medida de la longitud de los brotes laterales de las plantas, incluyendo el brote axilar apical o simpodial. Se descartaron los datos menores de 1 cm.

En la Tabla 14 se dan los datos de la longitud de los brotes laterales de las líneas utilizadas en el trabajo.

Tabla 14: Longitud de los brotes axilares a los 90 días postsiembra.

Se incluye el brote simpodial. Los datos son medias \pm SEM de 10 plantas por línea. Se excluyen los valores <1 cm

	Nº axila lateral									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MT	7,6 \pm 0,7	8,8 \pm 0,6	7,8 \pm 0,5	6,8 \pm 0,5	6,1 \pm 0,5	4,8 \pm 0,8	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>pSIGA20ox1::GUS</i>	6,9 \pm 0,9	8,3 \pm 0,6	8,1 \pm 0,4	7,2 \pm 0,6	6,5 \pm 0,7	5,2 \pm 0,8	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>DR5::GUS</i>	7,8 \pm 0,8	8,5 \pm 0,7	7,7 \pm 0,5	6,8 \pm 0,6	6,2 \pm 0,6	5,1 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
35S::CcGA20ox1	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	1,7 \pm 0,8	2,5 \pm 1,3	6,6 \pm 2,3	10,0 \pm 1,4	8,2 \pm 1,3	3,3 \pm 1,1	0,0 \pm 0,0
<i>35S::CcGA20ox1/pSIGA20ox1::GUS</i>	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	1,5 \pm 0,8	2,3 \pm 1,0	6,8 \pm 2,4	9,7 \pm 1,1	7,6 \pm 1,4	3,5 \pm 1,2	0,0 \pm 0,0
procera	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	2,4 \pm 1,1	6,2 \pm 0,5	7,6 \pm 0,8	7,3 \pm 0,8	7,6 \pm 0,4	7,2 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0
<i>procera/pSIGA20ox1::GUS</i>	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	2,8 \pm 1,2	6,5 \pm 0,7	7,1 \pm 0,6	7,4 \pm 0,6	7,3 \pm 0,5	7,7 \pm 0,6	0,0 \pm 0,0
Dwarf	9,8 \pm 0,7	11,5 \pm 0,7	11,0 \pm 0,8	9,8 \pm 0,8	8,1 \pm 0,6	7,3 \pm 0,4	7,4 \pm 0,6	7,6 \pm 0,5	8,2 \pm 0,8	0,0 \pm 0,0
<i>Dwarf/pSIGA20ox1::GUS</i>	10,3 \pm 0,8	10,9 \pm 0,5	11,6 \pm 0,7	10,6 \pm 0,8	8,9 \pm 0,9	7,6 \pm 0,7	7,8 \pm 0,5	8,1 \pm 0,6	7,4 \pm 0,7	0,0 \pm 0,0
<i>Dwarf/DR5::GUS</i>	9,8 \pm 0,8	11,2 \pm 0,5	10,9 \pm 0,8	10,3 \pm 0,7	8,5 \pm 0,6	7,1 \pm 0,5	7,5 \pm 0,6	7,7 \pm 0,7	7,9 \pm 0,8	0,0 \pm 0,0
Dwarf/35S::CcGA20ox1	2,3 \pm 0,9	4,0 \pm 1,3	7,0 \pm 1,3	9,0 \pm 1,7	11,1 \pm 1,4	12,0 \pm 1,0	15,3 \pm 0,9	13,8 \pm 0,5	12,5 \pm 0,6	12,3 \pm 0,2
<i>Dwarf/35S::CcGA20ox1/pSIGA20ox1::GUS</i>	2,7 \pm 0,8	3,6 \pm 1,1	6,7 \pm 0,9	9,6 \pm 1,2	10,4 \pm 1,1	11,7 \pm 1,3	14,7 \pm 1,2	14,1 \pm 0,7	12,6 \pm 0,8	11,7 \pm 0,7
dgt	6,9 \pm 2,5	10,8 \pm 2,1	12,1 \pm 1,7	10,8 \pm 0,5	6,8 \pm 1,3	8,4 \pm 1,3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>dgt/pSIGA20ox1::GUS</i>	7,3 \pm 2,3	11,2 \pm 1,9	11,3 \pm 1,4	11,4 \pm 0,7	7,6 \pm 1,1	7,9 \pm 0,8	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
entire	5,3 \pm 0,4	5,8 \pm 0,7	5,9 \pm 0,4	5,0 \pm 0,8	4,2 \pm 0,4	4,0 \pm 0,3	4,6 \pm 0,6	4,9 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>entire/pSIGA20ox1::GUS</i>	4,9 \pm 0,5	5,6 \pm 0,8	5,7 \pm 0,7	5,6 \pm 0,7	4,6 \pm 0,6	4,4 \pm 0,5	4,7 \pm 0,5	4,6 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
<i>entire/DR5::GUS</i>	5,1 \pm 0,4	5,5 \pm 0,7	5,6 \pm 0,5	5,3 \pm 0,7	4,3 \pm 0,4	4,1 \pm 0,5	4,3 \pm 0,5	4,8 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

La Fig. 30 muestra la arquitectura representativa de cada línea. Las comparaciones que se describen a continuación se llevaron a cabo entre MT y los distintos mutantes (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *Dwarf/35S::CcGA20ox1*, *dgt* y *entire*). Posteriormente se analizó el posible efecto de la introducción de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* sobre el fenotipo.

La longitud de los brotes laterales de MT disminuyó gradualmente desde la base de la planta hasta la parte superior. Por ello la arquitectura de las plantas a los 90 días de la siembra se asemeja a un cono truncado.

En *35S::CcGA20ox1* las tres yemas inferiores de no se desarrollaron incluso pasados tres meses de la siembra. Desde el brote de la axila 4 hasta el de la axila 7 la longitud aumentó significativamente. La longitud se redujo en los brotes posteriores.

procera no desarrolló los brotes axilares en las tres yemas inferiores de la planta. No hubo diferencias significativas en la longitud de los brotes desarrollados posteriormente, salvo el cuarto brote, que fue significativamente más corto.

Dwarf presentó una longitud mayor de los brotes laterales que MT. Una diferencia importante respecto a MT es que *Dwarf* desarrolló más brotes laterales debido a su mayor número de hojas.

La longitud de los brotes en el híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* aumentó significativamente desde el brote 1 al 7. La longitud en los brotes posteriores fue igual. La arquitectura de las plantas fue semejante a un cono invertido, lo que la diferenció de MT que mostró una arquitectura de cono truncado

En *dgt* la mayor longitud de los brotes axilares 3, 4 y 6 respecto a MT, produjo un cambio de arquitectura, de cono truncado (en MT) a óvalo (en *dgt*).

En *entire* la longitud de los brotes fue similar a los de MT. La arquitectura de la planta fue cilíndrica.

3.5.Efecto de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* sobre la longitud de los brotes axilares de las líneas mutantes

Como se ve en la Tabla 13, la incorporación de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* en MT y sus mutantes (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *dgt*, *entire* y *Dwarf/35S::CcGA20ox1*), no alteró significativamente su fenotipo. Esto indica que los resultados de expresión de *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS* en las líneas mutantes, que se describirán más adelante, no están afectadas por la presencia de los transgenes.

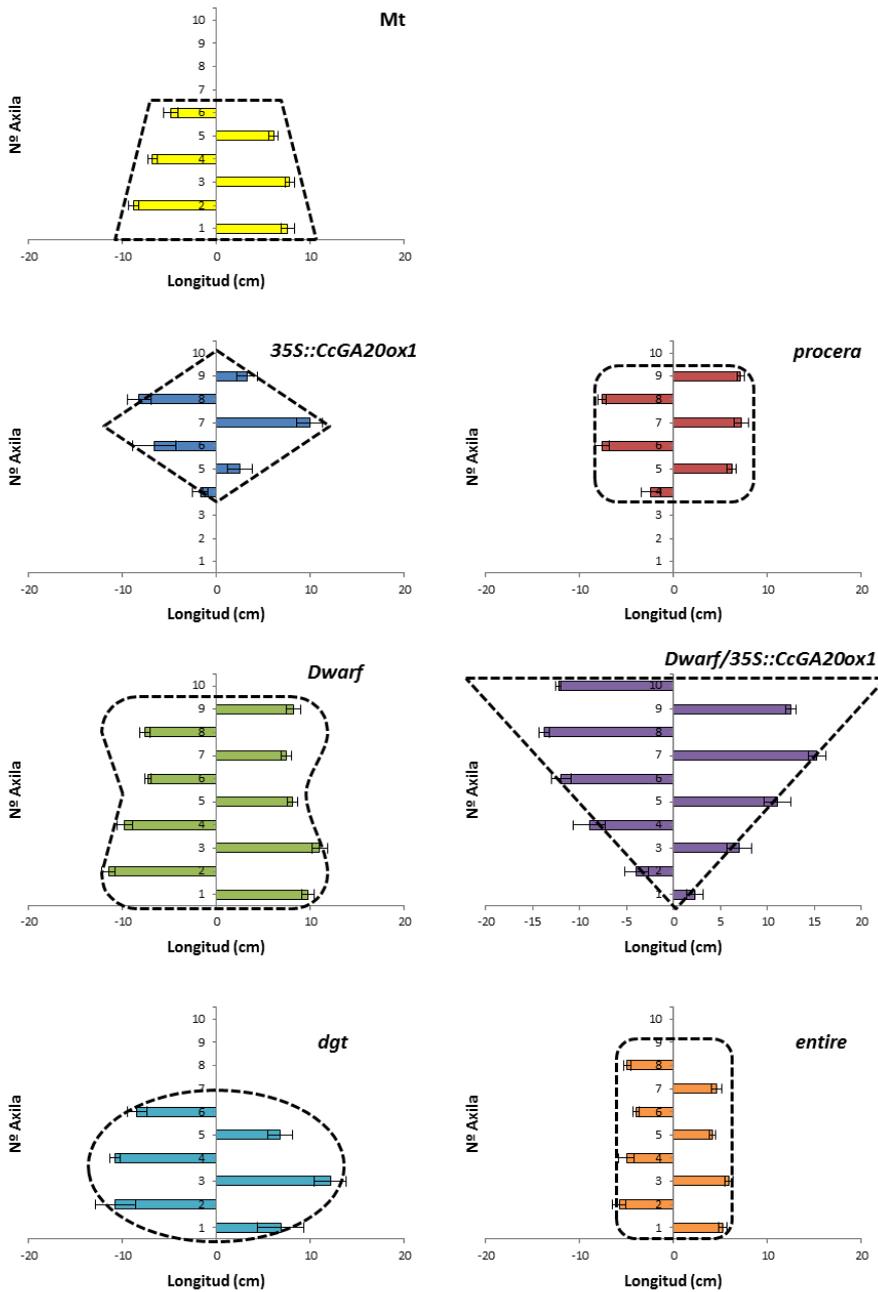


Fig. 30: Longitud final de los brotes laterales.

Se representan los datos a ambos lados del eje de coordenadas como símil a la disposición en la realidad. La línea punteada representa la forma geométrica de la planta.

Resultados II

Localización de la expresión de *SLGA20ox1* en ovarios durante la fructificación

II.A.- Análisis de la expresión de *SIGA20ox1* en ovario mediante el gen delator *GUS*

Se pretende conocer el efecto de la polinización y la aplicación de GA₃ y 2,4-D sobre la regulación de la expresión de *SIGA20ox1*. Para ello se utilizaron distintas líneas mutantes de MT (*35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *Dwarf/35S::CcGA20ox1*, *dgt* y *entire*), en las que se introdujo la construcción *pSIGA20ox1::GUS*, como se indica en Material y Métodos, con objeto de usar el gen *GUS* como delator de la expresión del promotor de *SIGA20ox1*.

1. Introducción

Se pretende conocer la regulación de la expresión del gen *SIGA20ox1* en ovario tras la polinización o aplicación de GA₃ y 2,4-D en MT silvestre y en plantas con mutaciones que afectan a biosíntesis y respuesta a hormonas (GAs, auxinas y BR). Para ello se utilizaron líneas en las que se introdujo el transgén *GUS*, con objeto de usar dicho gen como delator de la expresión del promotor. Se describen a continuación los resultados obtenidos de expresión en las líneas analizadas.

Se investigó el patrón de expresión de *GUS* en ovarios de tomate a diferentes tiempos entre 2 días antes y 10 días tras la antesis. Las flores fueron emasculadas 2 días antes de antesis y en el día equivalente a la antesis se realizó el tratamiento correspondiente (polinización o aplicación hormonal). Los ovarios no polinizados y no tratados se mantuvieron verdes en todos los estadios estudiados.

2. Expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en MT

En la línea silvestre con la construcción *pSIGA20ox1::GUS* (Fig. 31 y Tabla 15) no se observó señal colorimétrica en los ovarios en preantesis ni en antesis (estadios comunes para todos los tratamientos) (Fig. 31A-B).

En ovarios no polinizados (Fig. 31C-F) no se vio señal en ninguno de los tiempos analizados, hasta el día 10 post-antesis.

En ovarios polinizados (Fig. 31G-J) no hubo señal hasta el día 8 después de antesis. En el día 10 apareció señal dentro del óvulo fertilizado.

En ovarios tratados con GA₃ (Fig. 31K-N) y 2,4-D (Fig. 31O-R) (tratamientos que indujeron la fructificación del ovario) no se observó señal en ninguno de los tiempos analizados, hasta el día 10 post-antesis.

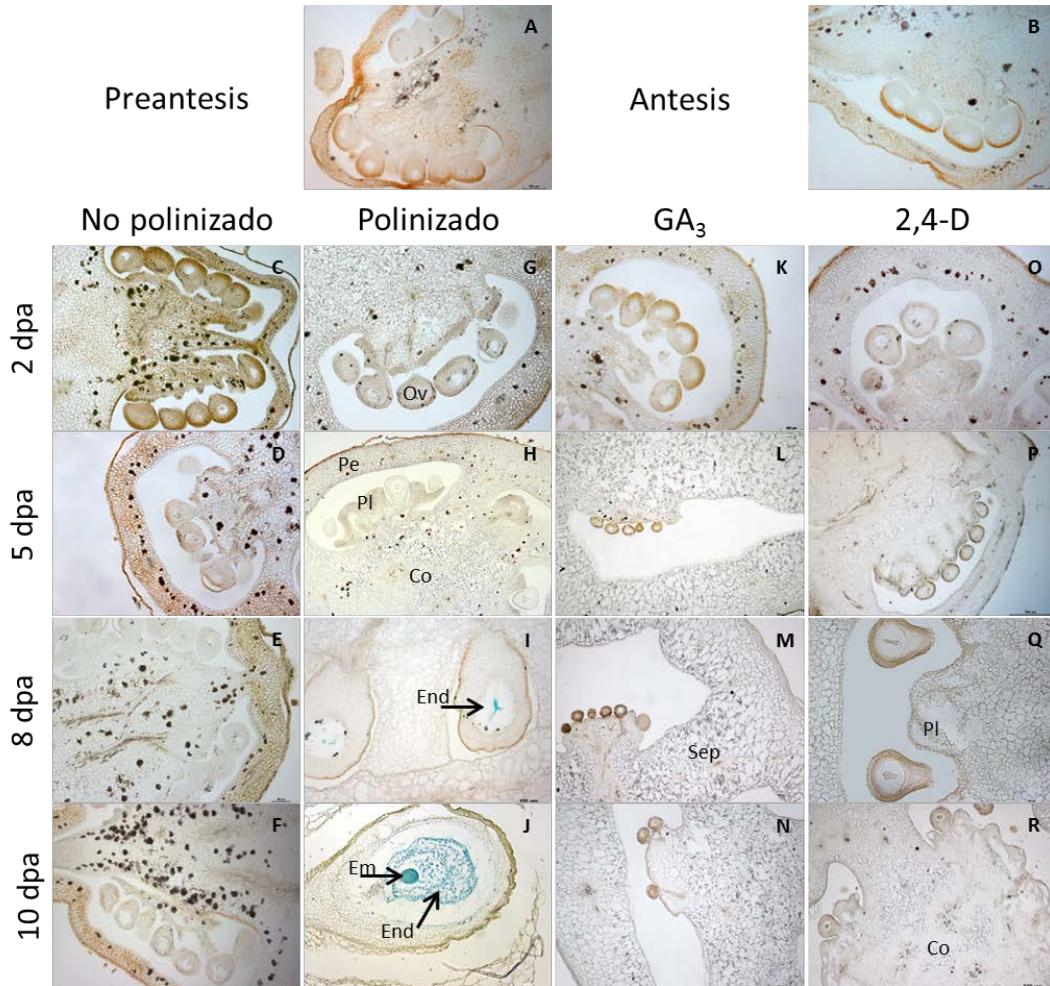


Fig. 31: Patrón de expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de tomate MT, desde preantesis a 10 días tras antesis.

Las flechas indican la localización de la expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios polinizados de 8 días en el endospermo y a los 10 días en el endospermo y embrión. También se indican distintas partes de los ovarios de tomate: Pe: pericarpo; Sep: septo; Pl: placenta; Co: columela; Ov: óvulo; End: endospermo; Em: embrión. Fotos A-G, I-K, O, Q con aumento 10x. Fotos H, L-N, P, R con aumento 4x.

Tabla 15: Resumen de la localización de la señal de expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de MT, entre preantesis y 10 días tras antesis polinizados, no polinizados y tratados con GA₃ y 2,4-D.

Preantesis	Columela		Antesis	Columela	
	Septo			Septo	
	Exocarpo			Exocarpo	
	Mesocarpo			Mesocarpo	
	Endocarpo			Endocarpo	
	Placenta			Placenta	
	Óvulo			Óvulo	
	Haces vasculares			Haces vasculares	
2DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Haces vasculares					
5DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Embrión					
Haces vasculares					
8DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Embrión					
Haces vasculares					
10DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Embrión					
Haces vasculares					

3. Expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en la línea *35S::CcGA20ox1*

La línea *pSIGA20ox1::GUS /35S::CcGA20ox1* se evaluó de la misma forma que la línea silvestre (Fig. 32 y Tabla 16).

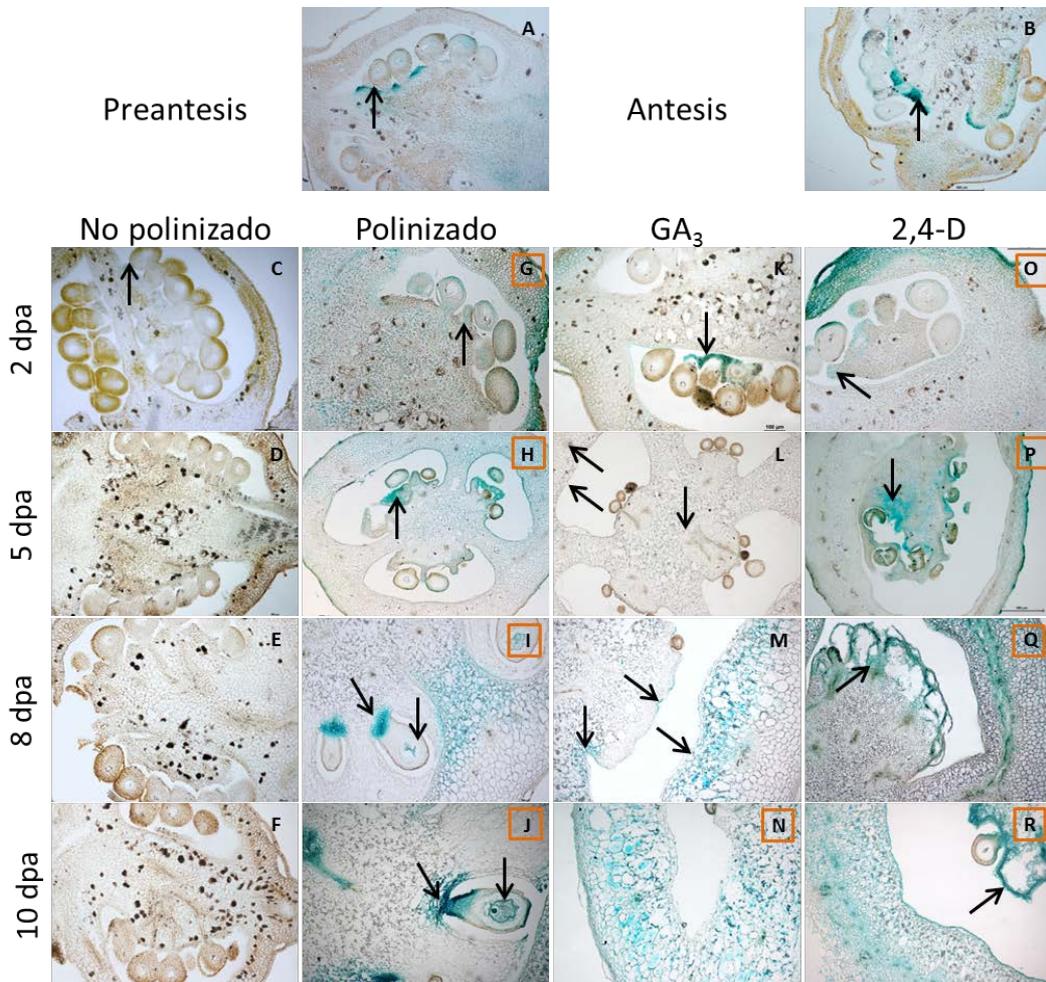


Fig. 32: Patrón de expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de tomate de la línea *35S::CcGA20ox1*, desde preantesis a 10 días tras antesis.

Las flechas indican la localización de la expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en los ovarios de tomate. Las fotos con un recuadro naranja indican que la expresión del transgén se localizó en la mayoría de los tejidos del ovario, indicando con flechas los tejidos más relevantes. Para más detalles ver texto y Tabla 16. Fotos A-G, I-K, O con aumento 10x. Fotos H, L-N, P-R con aumento 4x.

En los ovarios en preantesis y antesis se observó señal en la placenta (Fig. 32A-B).

En ovarios no polinizados se observó señal en la placenta tras dos días de la antesis (Fig. 32C), mientras que en los tiempos posteriores no se observó señal (Fig. 32D-F).

A los dos días de la polinización se observó una señal generalizada en los tejidos del ovario (Fig. 32G) y tras 5 días la señal se intensificó en la placenta (Fig. 32H). A los 8 días se observó señal en los integumentos del óvulo, calaza, columela, endocarpo y mesocarpo

(Fig. 32I). 10 días después de la polinización (Fig. 32J) los óvulos presentaron señal en todos los tejidos salvo el exocarpo.

Tabla 16: Resumen de la localización de la señal de expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de la línea 35S::*CcGA20ox1*, entre preantesis y 10 días tras antesis polinizados, no polinizados y tratados con GA₃ y 2,4-D.

Preantesis	Columela		Antesis	Columela	
	Septo			Septo	
	Exocarpo			Exocarpo	
	Mesocarpo			Mesocarpo	
	Endocarpo			Endocarpo	
	Placenta			Placenta	
	Óvulo			Óvulo	
	Haces vasculares			Haces vasculares	
2DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Haces vasculares					
5DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
Haces vasculares					
8DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
Haces vasculares					
10DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
Haces vasculares					

En ovarios no polinizados tratados con GA₃ se vio señal en todos los tejidos tras 2 días (Fig. 32-K), especialmente en la placenta. A los 5 días (Fig. 32-L) los ovarios mostraron

una débil señal en la columela, endocarpo y mesocarpo. Tras 8 días (Fig. 32M) la señal se localizó en la placenta, septos, endocarpo y mesocarpo. Al décimo día del tratamiento (Fig. 32N), los ovarios presentaron señal en todos los tejidos.

Los ovarios tratados con 2,4-D mostraron señal en todos los tejidos y con mayor intensidad en el pericarpo tras 2 días del tratamiento (Fig. 32O). A los 5 días se vio señal en todos los tejidos, siendo más intensa en el exocarpo y en la placenta que rodea a los óvulos (Fig. 32P). La señal en la placenta aumentó después de 8 días del tratamiento (Fig. 32Q). A los 10 días la señal se intensificó en todos los tejidos del ovario (Fig. 32R).

4. Expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en la línea *procera*

La línea *pSIGA20ox1::GUS /procera* se evaluó de la misma forma que la línea silvestre (Fig. 33 y Tabla 17).

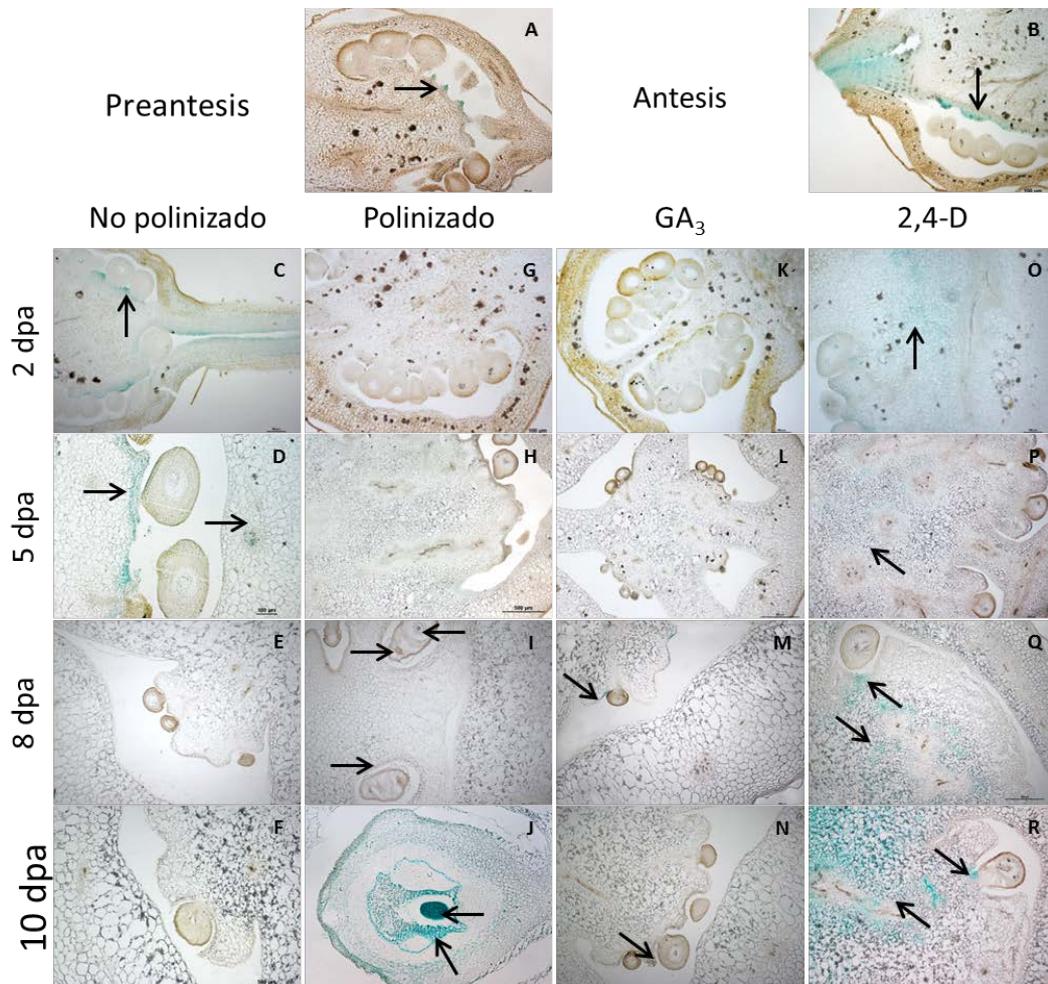


Fig. 33: Patrón de expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de tomate de la línea *procera*, desde preantesis a 10 días tras antesis.

Las flechas indican la localización de la expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en los ovarios de tomate. Para más detalles ver texto y Tabla 17. Fotos A-D, G, I-K, O con aumento 10x. Fotos E-F, H, L-N, P-R con aumento 4x.

Tabla 17: Resumen de la localización de la señal de expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de la línea *procera*, entre preantesis y 10 días tras antesis polinizados, no polinizados y tratados con GA₃ y 2,4-D.

Preantesis	Columela		Antesis	Columela	
	Septo			Septo	
	Exocarpo			Exocarpo	
	Mesocarpo			Mesocarpo	
	Endocarpo			Endocarpo	
	Placenta			Placenta	
	Óvulo			Óvulo	
	Haces vasculares			Haces vasculares	
2DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Haces vasculares				
5DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
Haces vasculares					
8DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
Haces vasculares					
10DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
Haces vasculares					

Se observó señal en la placenta de los ovarios en preantesis (Fig. 33A) y con mayor intensidad en antesis (Fig. 33B), mientras que no se observó en los ovarios de la línea *pSIGA20ox1::GUS* (Fig. 33A-B).

A los 2 días (Fig. 33C), los ovarios sin tratar presentaron señal en la placenta y a los 5 días (Fig. 33D) hubo señal en placenta y pericarpo, aunque de forma más suave. También se observó un aumento de tamaño, coincidiendo con la capacidad partenocárpica descrita de ésta línea. Los ovarios de 8 y 10 días (Fig. 33E-F) no mostraron señal.

Los ovarios polinizados de 2 y 5 días (Fig. 33G-H) no presentaron señal aunque se aprecia el aumento de tamaño asociado a la polinización. Los de 8 días (Fig. 33I) mostraron señal en columela, placenta, calaza e interior del óvulo. A los 10 días observó señal en la calaza, óvulos y embrión (Fig. 33J).

En ovarios tratados con GA₃ (Fig. 33K-N) no se observó señal a los 2 y 5 días del tratamiento, mientras que a los 8 y 10 días se vio una señal muy débil en la placenta y muy cerca de los óvulos.

Tras 2 y 5 días de la aplicación de auxina, los ovarios mostraron señal en la columela (Fig. 33O-R). A los 8 días se vio señal en la columela y en la base de los óvulos (Fig. 33Q). Esta señal se intensificó en los ovarios de 10 días (Fig. 33R).

5. Expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en la línea *Dwarf*

La línea *pSIGA20ox1::GUS /Dwarf* se evaluó de la misma forma que la línea silvestre (Fig. 34 y Tabla 18).

Los ovarios en preantesis (Fig. 34A) presentaron señal en la placenta, al contrario que en la línea silvestre.

Los ovarios en antesis (Fig. 34B) y los no tratados entre 2 y 10 días (Fig. 34C-F) no presentaron señal en ninguno de los tejidos.

Los ovarios polinizados de 2 días (Fig. 34G) no presentaron señal. A los 5 días hubo señal en la placenta y a los 8 también en la calaza (Fig. 34H-I). A los 10 días (Fig. 34J) se observó señal en los óvulos e intensamente en el embrión. También se observó señal en la calaza y en la placenta, aunque a niveles más bajos que en el embrión.

Los ovarios tratados con GA₃ presentaron señal en placenta a los 2 y 5 días del tratamiento (Fig. 34K-L). A los 8 días (Fig. 34M) se vio se vio señal en placenta y columela y a los 10 días (Fig. 34N) hubo señal en placenta y haces vasculares del pericarpo.

Todos los ovarios tratados con auxinas (Fig. 34O-R) mostraron señal, mientras que en la línea silvestre no se observó señal. A los 2 días (Fig. 34O) se vio señal en endocarpo, columela y placenta. Tras 5, 8 y 10 días (Fig. 34P-R) también se observó señal en el mesocarpo.

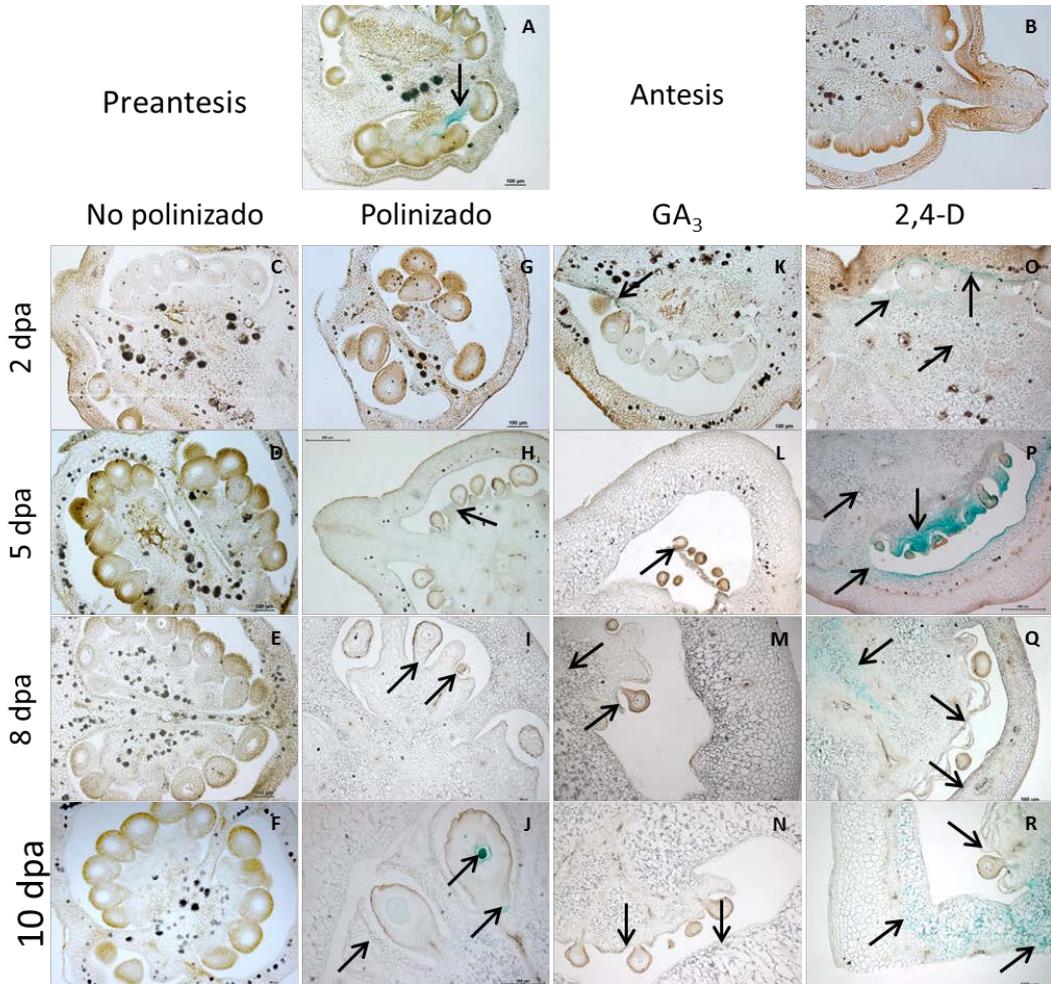


Fig. 34: Patrón de expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de tomate de la línea *Dwarf*, desde preantesis a 10 días tras antesis.

Las flechas indican la localización de la expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en los ovarios de tomate. Para más detalles ver texto y Tabla 18. Fotos A-G, K, O con aumento 10x. Fotos H-J, L-N, P-R con aumento 4x

Tabla 18: Resumen de la localización de la señal de expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de la línea *Dwarf*, entre preantesis y 10 días tras antesis polinizados, no polinizados y tratados con GA₃ y 2,4-D.

Preantesis	Columela		Antesis	Columela	
	Septo			Septo	
	Exocarpo			Exocarpo	
	Mesocarpo			Mesocarpo	
	Endocarpo			Endocarpo	
	Placenta			Placenta	
	Óvulo			Óvulo	
	Haces vasculares		Haces vasculares		
2DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Embrión				
5DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
		Embrión			
	Haces vasculares				
8DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
		Embrión			
	Haces vasculares				
10DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
		Embrión			
	Haces vasculares				

6. Expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en el híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1*

La línea *pSIGA20ox1::GUS/Dwarf/35S::CcGA20ox1* se evaluó de la misma forma que la línea silvestre (Fig. 35 y Tabla 19).

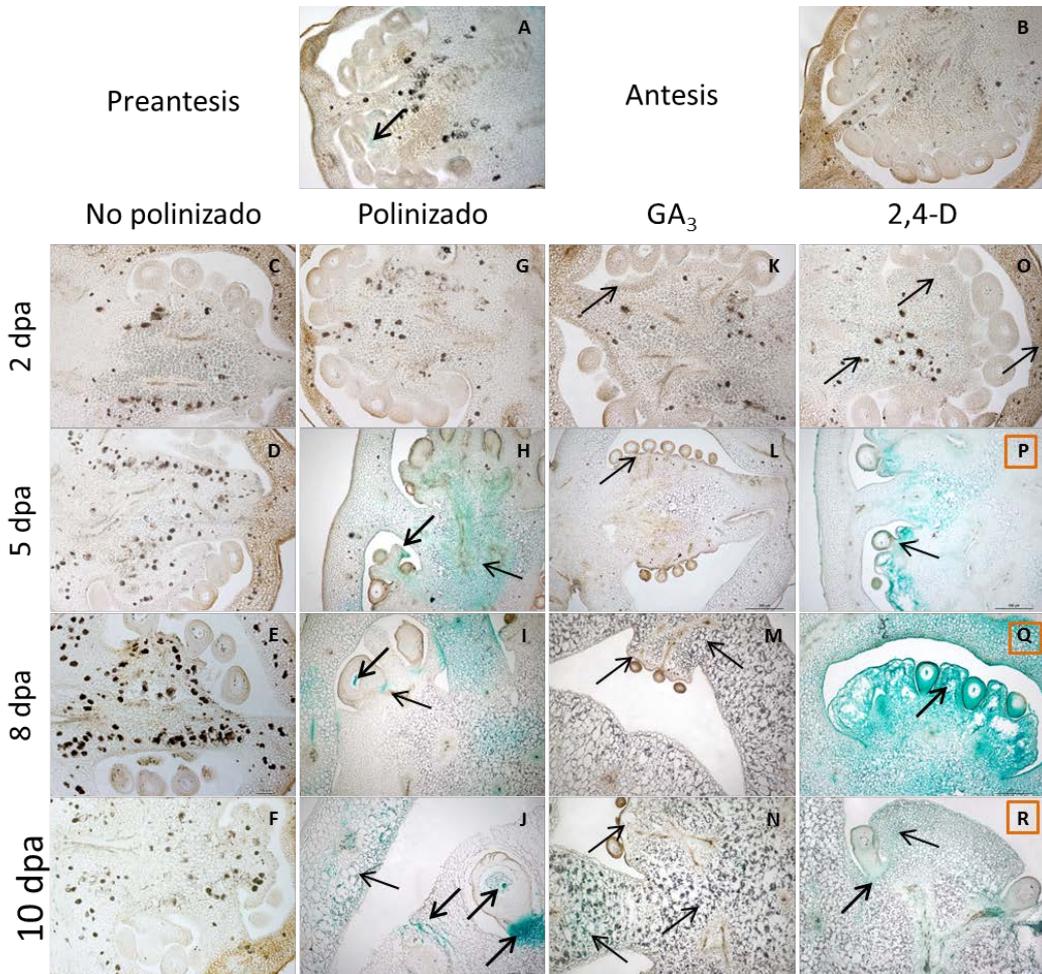


Fig. 35: Patrón de expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de tomate del híbrido *35S::CsGA20ox1/Dwarf*, desde preantesis a 10 días tras antesis.

Las flechas indican la localización de la expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en los ovarios de tomate. Las fotos con un recuadro naranja indican que la expresión del transgén se localizó en la mayoría de los tejidos del ovario, indicando con flechas los tejidos más relevantes. Para más detalles ver texto y Tabla 19. Fotos A-G, K, O con aumento 10x. Fotos H-J, L-N, P-R con aumento 4x.

Los ovarios en preantesis (Fig. 35A) presentaron señal en la placenta, al contrario que en la línea silvestre.

Los ovarios en antesis (Fig. 35B) y los no tratados entre 2 y 10 días (Fig. 35C-F) no presentaron señal en ninguno de los tejidos.

Los ovarios polinizados de 2 días (Fig. 35G) no presentaron señal. A los 5 días hubo señal en la placenta y a los 8 también en la calaza (Fig. 35H-I). A los 10 días (Fig. 35J) se

observó señal en los óvulos e intensamente en el embrión. También se observó señal en la calaza y en la placenta, aunque a niveles más bajos que en el embrión.

Los ovarios tratados con GA₃ presentaron señal en placenta a los 2 y 5 días del tratamiento (Fig. 35K-L). A los 8 días (Fig. 35M) se vio señal en placenta y columela y a los 10 días (Fig. 35N) hubo señal en placenta y haces vasculares del pericarpo.

Todos los ovarios tratados con auxinas (Fig. 35O-R) mostraron señal, mientras que en la línea silvestre no se observó señal. A los 2 días (Fig. 35O) se vio señal en endocarpo, columela y placenta. Tras 5, 8 y 10 días (Fig. 35P-R) también se observó señal en el mesocarpo.

Tabla 19: Resumen de la localización de la señal de expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios del híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1*, entre preantesis y 10 días tras antesis polinizados, no polinizados y tratados con GA₃ y 2,4-D.

Preantesis	Columela		Antesis	Columela	
	Septo			Septo	
	Exocarpo			Exocarpo	
	Mesocarpo			Mesocarpo	
	Endocarpo			Endocarpo	
	Placenta			Placenta	
	Óvulo			Óvulo	
	Haces vasculares			Haces vasculares	
2DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Haces vasculares					
5DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
	Haces vasculares				
8DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
	Haces vasculares				
10DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
	Haces vasculares				

7. Expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en la línea *dgt*

La línea *pSIGA20ox1::GUS /dgt* se evaluó de la misma forma que la línea silvestre (Fig. 36 y Tabla 20).

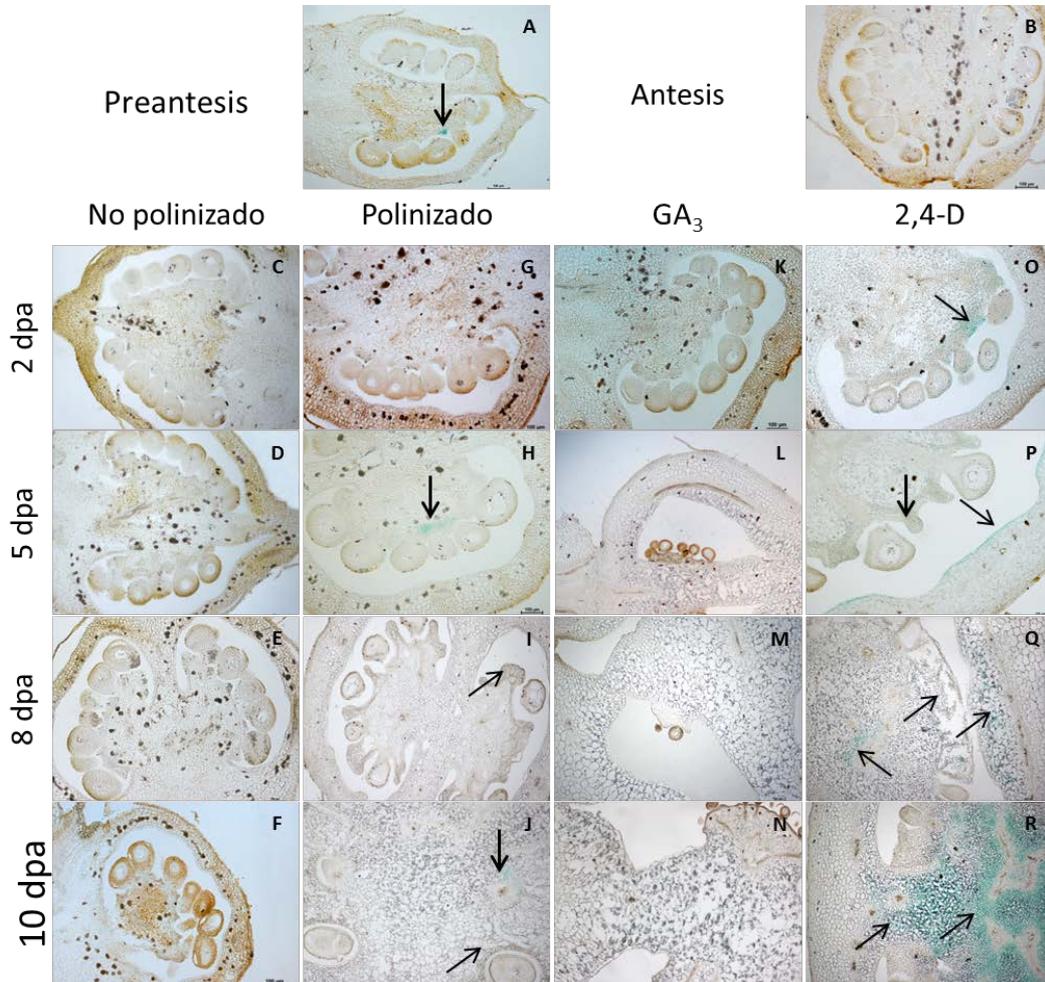


Fig. 36: Patrón de expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de tomate de la línea *dgt*, desde preantesis a 10 días tras antesis.

Las flechas indican la localización de la expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en los ovarios de tomate. Para más detalles ver texto y Tabla 20. Fotos A-H, K, O, P con aumento 10x. Fotos I-J, L-N, Q, R con aumento 4x.

Los ovarios en estado de preantesis presentaron señal en la placenta (Fig. 36A), mientras que en los ovarios en antesis (Fig. 36B) y en los no polinizados (Fig. 36C-F) no se observó señal en ninguno de los tiempos estudiados.

Tras la polinización, los ovarios de 2 días (Fig. 36G) no presentaron señal. En los ovarios de 5 y 8 días (Fig. 36H-I) se vio señal en la placenta. A los 10 días (Fig. 36J) se observó señal en la placenta y en la columela.

En ovarios tratados con GA_3 (Fig. 36K-N) no se observó señal en ninguno de los tiempos estudiados, al igual que en la línea silvestre.

Tras 2 días del tratamiento con auxina (Fig. 36O), los ovarios mostraron señal en la placenta. A los 5 días (Fig. 36P) se vio señal en placenta y endocarpo. Al octavo día (Fig. 36Q) también se observó en columela, mientras que en los ovarios de 10 días (Fig. 36R) sólo mostraron señal en columela y septos.

Tabla 20: Resumen de la localización de la señal de expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de la línea *dgt*, entre preantesis y 10 días tras antesis polinizados, no polinizados y tratados con GA₃ y 2,4-D.

Preantesis	Columela		Antesis	Columela	
	Septo			Septo	
	Exocarpo			Exocarpo	
	Mesocarpo			Mesocarpo	
	Endocarpo			Endocarpo	
	Placenta			Placenta	
	Óvulo			Óvulo	
	Haces vasculares			Haces vasculares	
2DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Haces vasculares					
5DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Embrión					
Haces vasculares					
8DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Embrión					
Haces vasculares					
10DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Embrión					
Haces vasculares					

8. Expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en la línea *entire*

La línea *pSIGA20ox1::GUS /entire* se evaluó de la misma forma que la línea silvestre (Fig. 37 y Tabla 21).

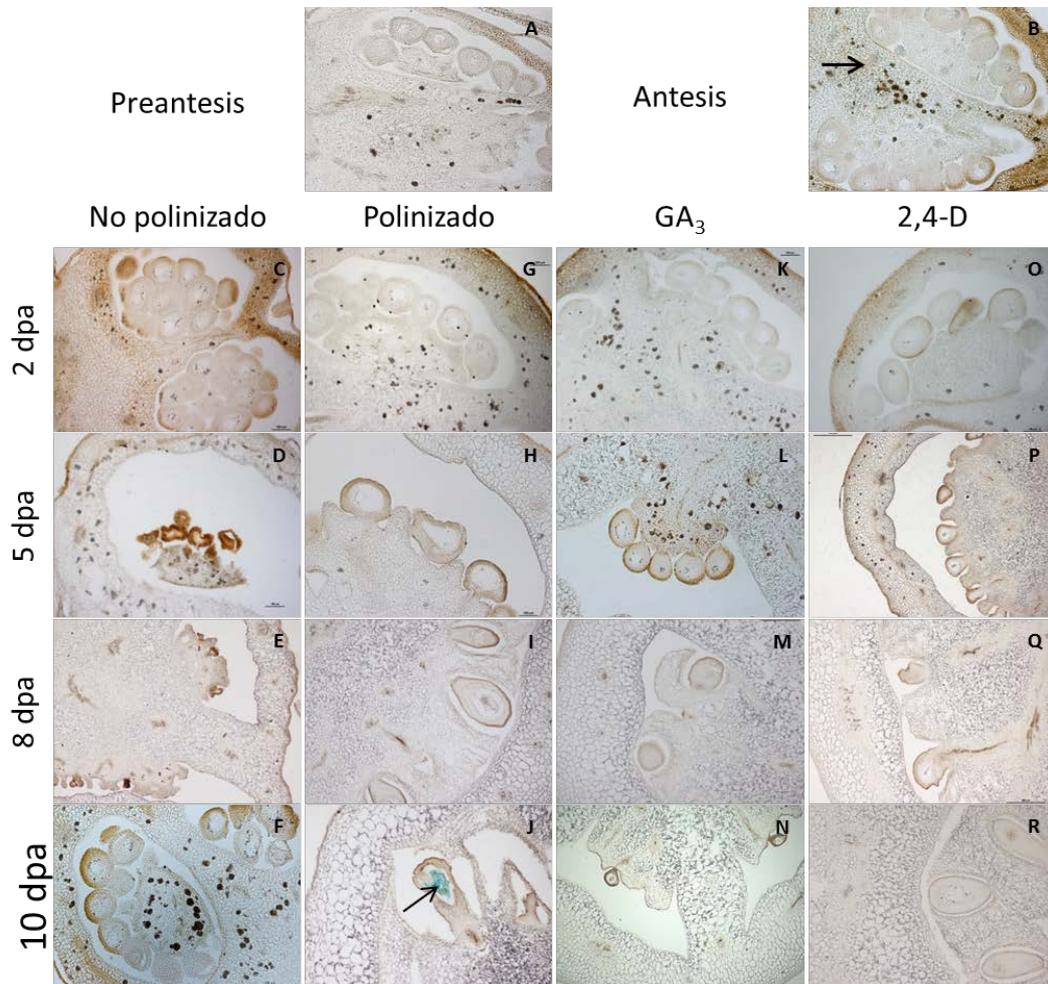


Fig. 37: Patrón de expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de tomate de la línea *entire* desde preantesis a 10 días tras antesis.

Las flechas indican la localización de la expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en los ovarios de tomate. Para más detalles ver texto y Tabla 21. Fotos A-D, F-H, K, L, O con aumento 10x. Fotos E, I, J, M, N, P-R con aumento 4x.

En estado de preantesis (Fig. 37A), los ovarios no presentaron señal, mientras que en antesis (Fig. 37B) hubo señal en la columela.

En los ovarios no polinizados (Fig. 37C-F) no se observó señal en ninguno de los tiempos estudiados.

Los ovarios polinizados (Fig. 37G-J) no presentaron señal hasta el día 10, donde se localizó en el interior del óvulo y embrión.

En los ovarios tratados con GA_3 (Fig. 37K-N) no se vio señal en ninguno de los tiempos estudiados.

Tras el tratamiento con auxinas (Fig. 370-R) no se observó señal en los ovarios en ninguno de los tiempos estudiados.

La línea *entire* sólo se diferenció de la línea silvestre en el estadio de antesis, donde los ovarios presentaron señal en la columela, mientras que en la silvestre no.

Tabla 21: Resumen de la localización de la señal de expresión del transgén *pSIGA20ox1::GUS* en ovarios de la línea *entire*, entre preantesis y 10 días tras antesis polinizados, no polinizados y tratados con GA₃ y 2,4-D.

Preantesis	Columela		Antesis	Columela	
	Septo			Septo	
	Exocarpo			Exocarpo	
	Mesocarpo			Mesocarpo	
	Endocarpo			Endocarpo	
	Placenta			Placenta	
	Óvulo			Óvulo	
	Haces vasculares			Haces vasculares	
2DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Haces vasculares					
5DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Haces vasculares					
8DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Haces vasculares					
10DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
Haces vasculares					

II. B: Análisis de la expresión de *SIGA20ox1* mediante hibridación *in situ*.

1. Introducción

Las GAs juegan un papel importante en la fructificación del ovario de tomate y sus niveles están regulados por la polinización y las auxinas. Ambos actúan sobre la ruta de biosíntesis de GAs induciendo la síntesis de la enzima *SIGA20ox1*. Por ello se determinó el patrón de expresión en el ovario del gen *SIGA20ox1*, mediante la técnica de hibridación *in situ* utilizando sondas de RNA marcadas con digoxigenina.

2. Diseño de las sondas mediante análisis *in silico*

El gen *SIGA20ox1* (Solyc03g006880.2) forma parte de una familia génica compuesta por cuatro miembros en la que se incluyen también *SIGA20ox2* (Solyc06g035530.2), *SIGA20ox3* (Solyc11g072310.1) y *SIGA20ox4* (Solyc01g093980.2). Todos ellos codifican dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato. En la Tabla 22 se dan los datos de longitud génica, de la región codificante y de la proteína de los cuatro genes.

Tabla 22: Miembros de la familia génica GA20ox de tomate

Gen	Longitud (pb)	RNAm (pb)	Nº intrones	Nº exones	Proteína (aa)
<i>SIGA20ox1</i>	1791	1468	2	3	378
<i>SIGA20ox2</i>	2199	1358	2	3	372
<i>SIGA20ox3</i>	2399	1392	2	3	379
<i>SIGA20ox4</i>	2018	1448	2	3	364

En la Fig. 38 se muestra el alineamiento de las secuencias codificantes de los cuatro genes *GA20ox*. Se utilizó la herramienta <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> para poder seleccionar posibles regiones de diseño de sondas específicas de *SIGA20ox1*. En la misma figura también se representa la localización de las sondas específicas de *SIGA20ox1*. Las secuencias proteicas derivadas de los genes *GA20ox* de tomate se alinearon y se observó una alta conservación de los aminoácidos, como hacía prever la secuencia génica (Fig.39).

En la Tabla 23 se dan los datos de porcentaje de similitud y porcentaje de sitios idénticos, respecto de *SIGA20ox1*, de las secuencias génicas de los miembros de la familia *GA20ox* de tomate calculadas mediante alineamiento con la herramienta MUSCLE del programa Geneious 3.6.2. De la misma forma, en la Tabla 24 se presentan los datos de porcentaje de similitud y porcentaje de sitios idénticos de las secuencias de los genes *SIGA20ox2*, 3 y 4 de tomate con respecto a las secuencias de las sondas seleccionadas para la detección de *SIGA20ox1* mediante hibridación *in situ*.

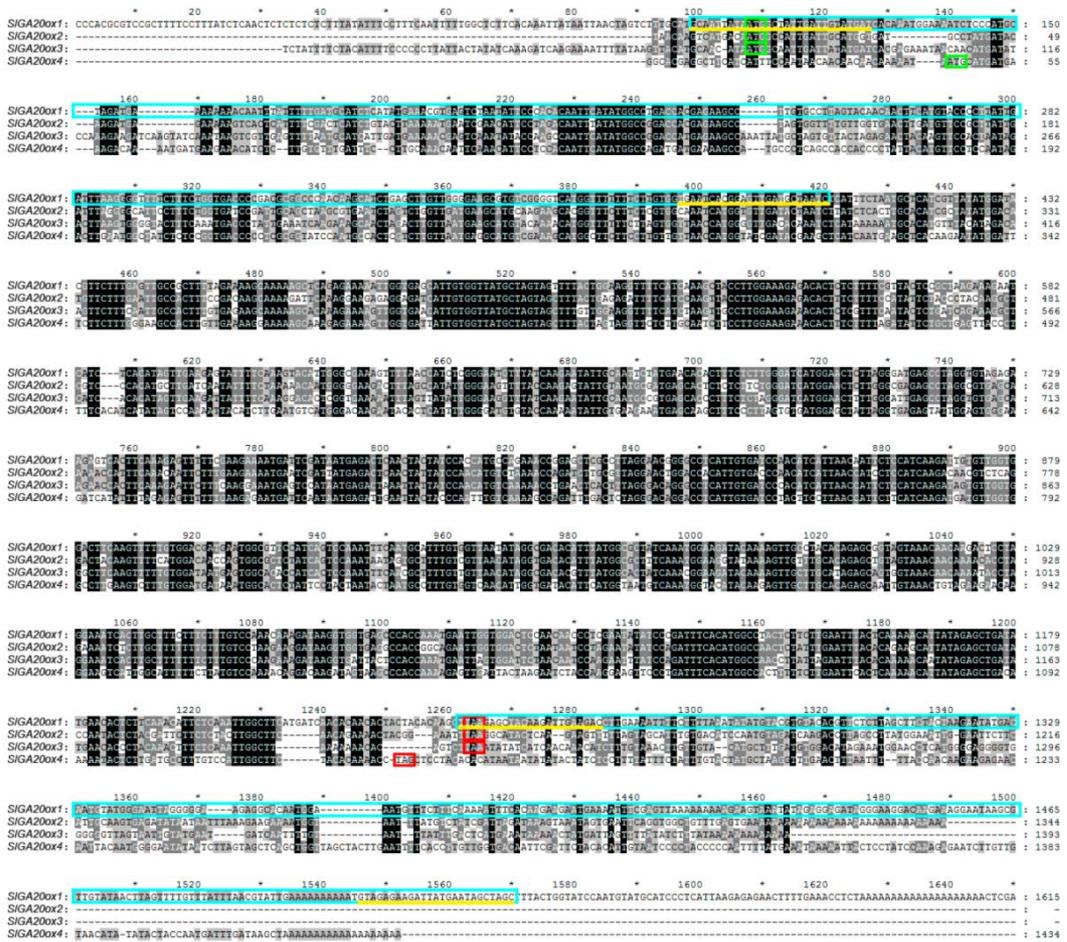


Fig. 38: Alineamiento de las secuencias de los genes *GA20ox* de tomate donde se muestra las regiones seleccionadas para el diseño de las sondas de hibridación.

Los recuadros azules corresponden a las sondas utilizadas. Los oligos utilizados para la copia y amplificación de las sondas se encuentran subrayados en amarillo. El codón de inicio se indica encuadrado en verde y el codón de stop en rojo.

Tabla 23: Porcentaje de similitud y de sitios idénticos de los genes *GA20ox* de tomate, con respecto al gen *SIGA20ox1*

	<i>SIGA20ox2</i>	<i>SIGA20ox3</i>	<i>SIGA20ox4</i>
% similitud	65,7	63,8	56,6
% sitios idénticos	67,7	64,2	57,1

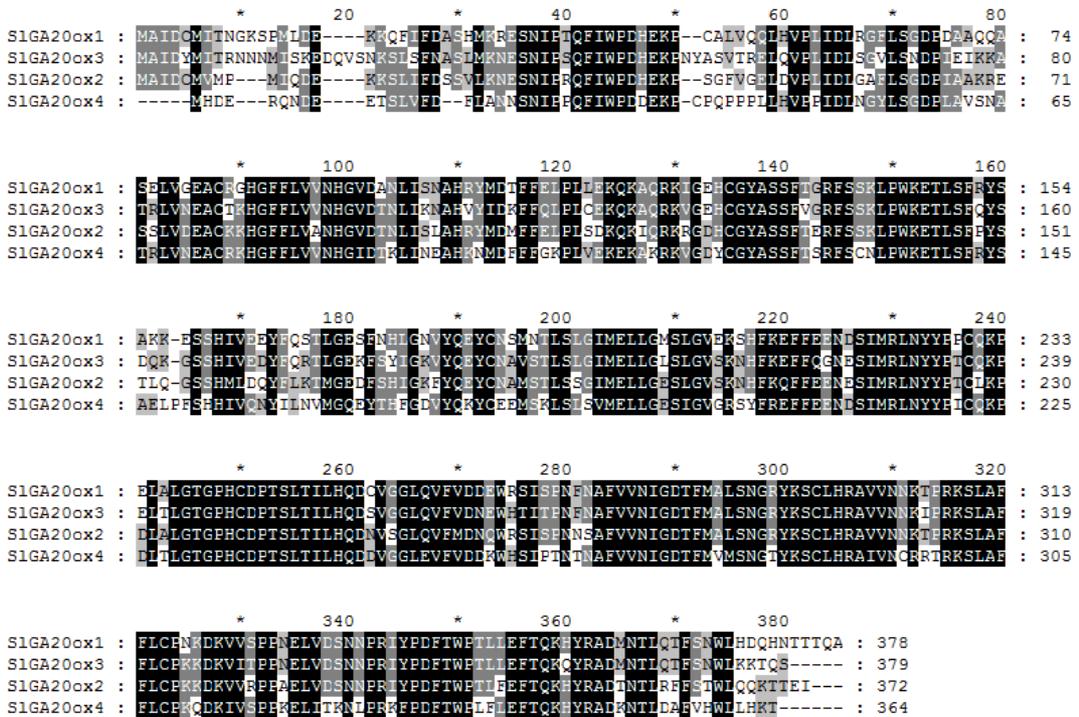


Fig. 39: Alineamiento de la secuencia proteica de los genes GA20ox de tomate.

Tabla 24: Porcentaje de similitud y de sitios idénticos de las sondas seleccionadas para la hibridación *in situ* con los genes GA20ox de tomate.

			SIGA20ox2	SIGA20ox3	SIGA20ox4
Sonda I	Alineamiento completo	% similitud	15,9	14,6	15,3
		% sitios idénticos	18,5	14,8	17,4
	Alineamiento parcial	% similitud	54,7	57,6	54,9
		% sitios idénticos	54,7	57,6	54,9
Sonda II	Alineamiento completo	% similitud	68,1	53,7	13,9
		% sitios idénticos	92,8	87	20,3
	Alineamiento parcial	% similitud	69,1	66,7	63,7
		% sitios idénticos	69,1	66,7	63,7

3. Selección de la sonda a utilizar

El patrón de expresión de *SIGA20ox1* se determinó mediante hibridación *in situ* de sondas RNA marcadas con digoxigenina utilizando las dos sondas del gen seleccionadas en el apartado anterior, una localizada en la región 5' (Sonda II) y otra en la región 3' (Sonda I). Con objeto de conocer cuál de las dos sondas daba más señal, se ensayaron por separado, obteniéndose una señal casi inapreciable con la Sonda I (datos no presentados) y algo más fuerte con la Sonda II. Con el fin de aumentar la señal obtenida se utilizó una mezcla de ambas sondas para la hibridación (Fig. 38), lo que permitió la mejora sustancial

de la visualización de la señal. Esta técnica permitió duplicar la longitud de zona hibridada, evitando la hidrólisis de una única sonda de la misma longitud y la generación de fragmentos marcados que pudieran hibridar inespecíficamente, dando lugar a una señal errónea.

En la Fig. 40 se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de hibridación *in situ* para la elección de la sonda. Se utilizaron ovarios polinizados de 5 y 10 días.

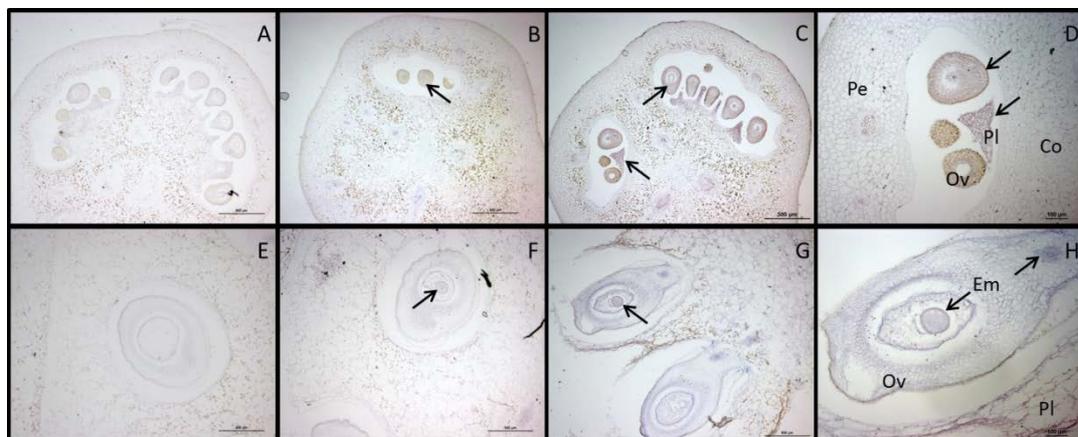


Fig. 40: Localización transcritos SIGA20ox1 en ovarios polinizados de 5 y 10 días.

Resultados con una o dos sondas. A-D) ovario polinizado de 5 días. E-H) ovario polinizado de 10 días. A-E) Hibridación sonda sens. B-F) Hibridación sonda antisens II. C-G) Hibridación mezcla sondas antisens I y II. D-H) Ampliación de los cortes C y G. Pl: placenta; Ov: óvulo; Pe: pericarpio; Co: columela; Em: embrión. Fotos A-C y E-G con aumento 4x. Fotos D y H con aumento 10x.

En ovarios polinizados de 5 días hibridados con la Sonda II se observó una débil señal en placenta y óvulos (Fig. 40B). Esta señal aumentó con la hibridación conjunta de las Sondas I y II (Fig. 40C-D). En ovarios polinizados de 10 días la señal obtenida con la Sonda II fue muy baja intuyéndose en el embrión en formación (Fig. 40F). En el mismo estadio hibridado con las sondas I y II la señal se volvió más clara tanto en el óvulo como en el embrión (Fig. 40G-H).

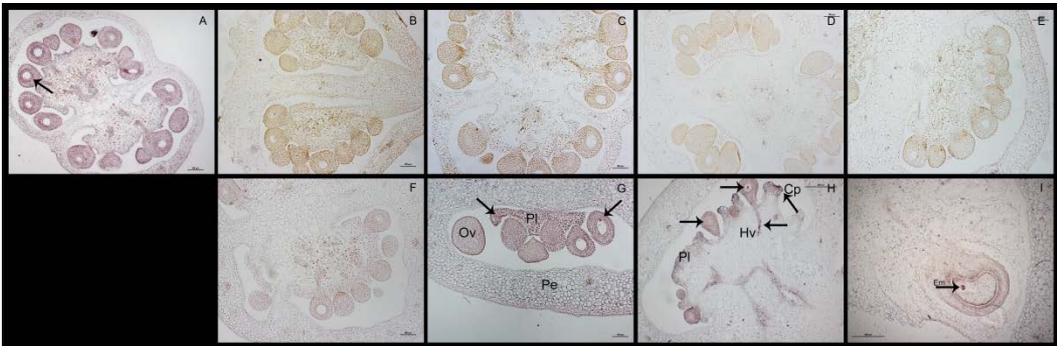
Se concluyó por lo tanto que para la óptima visualización de los transcritos era necesaria la presencia de ambas sondas.

4. Localización de transcritos en ovarios tras polinización

En la Fig. 41 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de hibridación *in situ* en ovarios, desde preantesis hasta 10 días de edad, polinizados y no polinizados.

En preantesis (Fig. 41A) se observó una señal generalizada en todos los tejidos. La mayor concentración de señal se observó en los ovarios y el tejido vascular.

En los ovarios en estado equivalente a antesis no se observó señal (Fig. 41B), ni en los ovarios no polinizados de 2 a 10 días (Fig. 41G-I).



Los estadios polinizados presentaron señal (Fig. 41C-E), asociando el proceso de polinización/fecundación de los ovarios/óvulos con el aumento de GAs en el ovario. Este aumento de señal se produjo en la placenta y óvulos al tercer día de la polinización. Al quinto día, se observó señal en los haces vasculares, óvulos y placenta, con especial intensidad en las crestas placentarias. 10 días tras la polinización la señal se concentró especialmente en el embrión.

5. Localización en ovarios no polinizados tratados con auxina

Se realizó la localización de la expresión de *SIGA20ox1* mediante hibridación *in situ* en ovarios no polinizados de 5 días tras la aplicación de 2,4-D. El resultado fue una señal débil en todos los tejidos, a diferencia de los ovarios polinizados en el mismo estadio que presentaban la señal localizada en las crestas placentarias, haces vasculares y y óvulos.

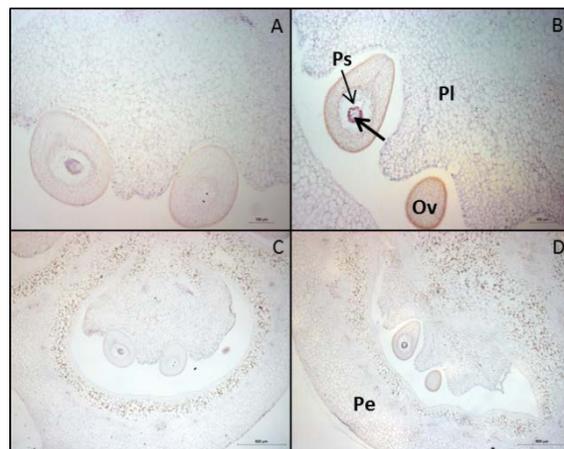


Fig. 42: Localización de SIGA20ox-1 en ovarios de 5 días tratados con 2,4-D.

A-C: secciones hibridadas con la sonda sens como control negativo. B-D: secciones hibridadas con la sonda antisentido SIGA20ox-1 I. Se observó una débil acumulación de mRNA de SIGA20ox-1 en todos los tejidos. Las fotografías se realizaron con un aumento 4x en el caso de C y D, y con un aumento de 10x en A y B.

Resultados III

**Localización espacial y temporal de auxinas en el ovario
durante la fructificación**

III.A.- Análisis de la expresión de *DR5* en ovario mediante el gen delator *GUS*

Se sabe que las auxinas juegan un papel importante en la fructificación de tomate. Para profundizar en este conocimiento se ha llevado a cabo por un lado, el estudio de la expresión del transgén *DR5::GUS* como gen delator de la respuesta a auxinas. Y por el otro el patrón de distribución del ácido indolacético (IAA) en el ovario de MT mediante inmunolocalización.

1. Introducción

Se pretende conocer el efecto de la polinización y la aplicación de GA_3 y 2,4-D sobre la regulación de la expresión de *DR5* (gen de respuesta a auxinas). Para ello se utilizó una línea transgénica *DR5::GUS* de MT en la que se introdujeron los genes *Dwarf* y *entire*, como se indica en Material y Métodos, con objeto de usar el gen *GUS* como delator de la expresión de *DR5*.

Utilizando estas líneas se investigó el patrón de expresión de *GUS* en ovarios de tomate a diferentes tiempos entre 2 días antes y 10 días tras la antesis. Las flores fueron emasculadas 2 días antes de antesis y en el día equivalente a la antesis se realizó el tratamiento correspondiente (polinización o aplicación de GA_3 o 2,4-D). Los ovarios no polinizados y no tratados se mantuvieron verdes en todos los estadios estudiados.

La introducción del transgén en la línea *Dwarf* se realizó con objeto de evaluar el papel de los BR en la respuesta de auxinas y poder comparar el patrón de expresión de GAs y auxinas, por medio de las construcciones *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS*.

La línea *entire* representa una oportunidad de estudiar la interacción existente entre auxinas y GAs en la fructificación, ya que el *IAA9* es un elemento de la respuesta auxinas que cuya transcripción se reduce tras la polinización y su regulación negativa induce la partenocarpia (Wang et al. 2009).

2. Expresión de *DR5* en MT

Se analizó el patrón de expresión del transgén *DR5::GUS* en el cultivar MT en ovarios a diferentes tiempos entre 2 días antes y 10 días después de antesis (Fig. 43 y Tabla 25).

En ovarios en preantesis (Fig. 43A) se observó señal en columela, endocarpo y óvulos. Los ovarios en estadio equivalente a antesis (Fig. 43B) y los no polinizados no presentaron señal en ninguno de los tejidos (Fig. 43C-F).

Los ovarios polinizados de 2 días (Fig. 43G) mostraron señal en la columela, pericarpo, placenta y óvulos. Tras 5 días de la polinización (Fig. 43H) se vio señal en la columela, septo, mesocarpo, endocarpo, placenta e interior del óvulo. A los 8 días (Fig. 43I) hubo señal en la columela, septos, mesocarpo, endocarpo, placenta, calaza, embrión y

haces vasculares. Los ovarios polinizados de 10 días (Fig. 43J) presentaron señal en columela, septos, endocarpo, mesocarpo, haces vasculares, calaza y embrión.

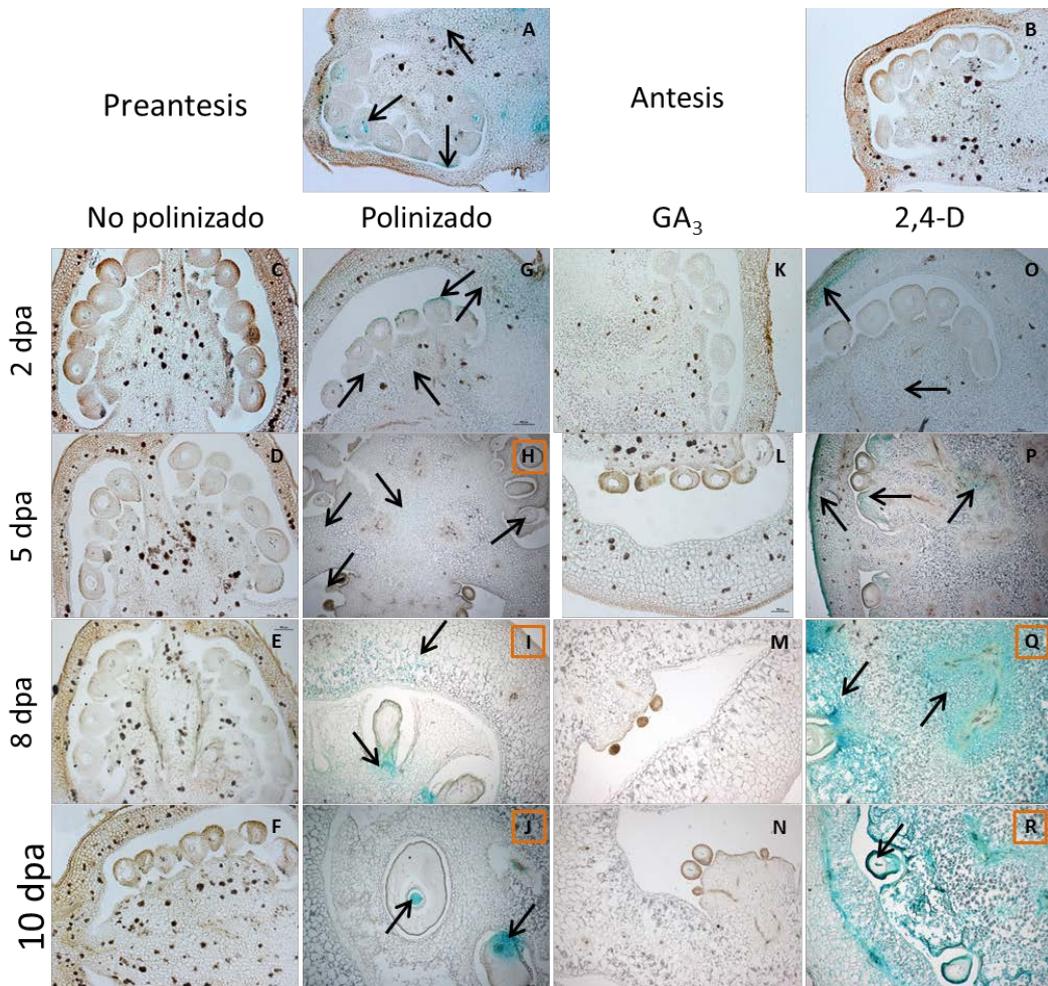


Fig. 43: Patrón de expresión de DR5 en ovarios de tomate entre preantesis y 10 después de antesis.

Las flechas indican la localización de la expresión del transgén *DR5::GUS* en los ovarios de tomate. Las fotos con un recuadro naranja indican que la expresión del transgén se localizó en la mayoría de los tejidos del ovario, indicando con flechas los tejidos más relevantes. Para más detalles ver texto y Tabla 25. Fotos A-G, K, L, O con aumento 10x. Fotos H-J, M, N, P-R con aumento 4x.

Tras la aplicación de GA_3 a los ovarios (Fig. 43K-N), no hubo señal en los tejidos en ninguno de los tiempos estudiados.

Los ovarios tratados con auxinas de 2 días (Fig. 43O) tuvieron señal en la columela, septos, y pericarpo. Tras 5 días del tratamiento (Fig. 43P), la señal también se encontró en la placenta. Al octavo día (Fig. 43Q) la señal se vio en los mismos tejidos que a los 5 días, pero la intensidad fue sustancialmente mayor. A los 10 días la señal (Fig. 43R) se localizó en todos los tejidos excepto en el exocarpo.

Tabla 25: Resumen de la localización de la señal de expresión del transgén *DR5::GUS* en ovarios de la línea silvestre, entre preantesis y 10 días tras antesis polinizados, no polinizados y tratados con GA₃ y 2,4-D.

Preantesis	Columela		Antesis	Columela	
	Septo			Septo	
	Exocarpo			Exocarpo	
	Mesocarpo			Mesocarpo	
	Endocarpo			Endocarpo	
	Placenta			Placenta	
	Óvulo			Óvulo	
	Haces vasculares			Haces vasculares	
2DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
5DPA	Embrión				
	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
8DPA	Óvulo				
	Embrión				
	Haces vasculares				
	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
10DPA	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
	Haces vasculares				
	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				

3. Expresión de *DR5* en la línea *Dwarf*

La línea *DR5::GUS/Dwarf* se evaluó de la misma forma que la línea silvestre (Fig. 44 y Tabla 26).

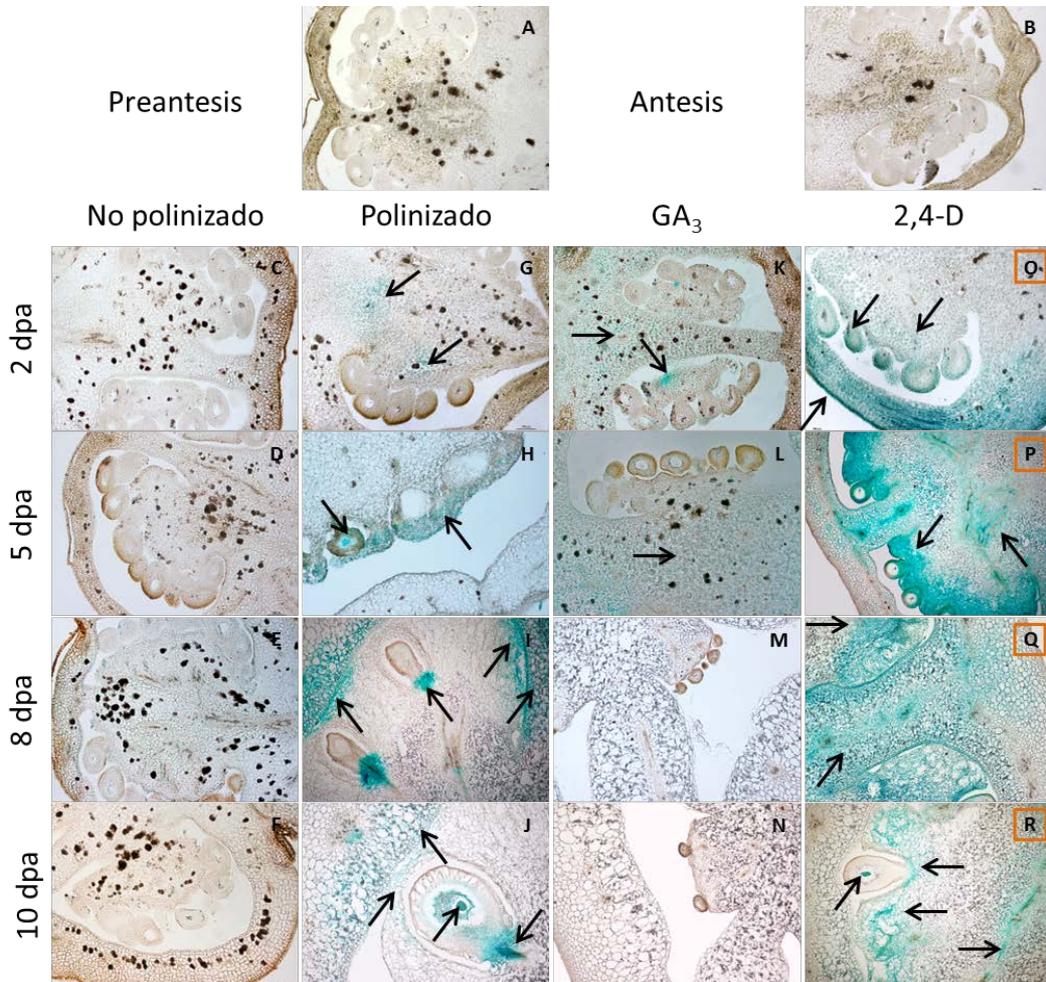


Fig. 44: Patrón de expresión de *DR5* en ovarios de tomate de la línea *Dwarf*, desde preantesis a 10 días tras antesis.

Las flechas indican la localización de la expresión del transgén *DR5::GUS* en los ovarios de tomate. Las fotos con un recuadro naranja indican que la expresión del transgén se localizó en la mayoría de los tejidos del ovario, indicando con flechas los tejidos más relevantes. Para más detalles ver texto y Tabla 26.

Los ovarios en preantesis, antesis y no polinizados (Fig. 44A-F), no presentaron señal.

A los 2 días de la polinización (Fig. 44G), hubo señal en la columela y de forma muy suave en la placenta. Los ovarios polinizados de 5 días (Fig. 44H) presentaron señal en la placenta y en el interior del óvulo. En los ovarios de 8 días (Fig. 44I) se detectó señal en el mesocarpo, endocarpo y septos. También en los haces vasculares, calaza, placenta, y embrión. Al décimo día (Fig. 44J) la señal se localizó en el mesocarpo, septos, placenta, calaza y embrión.

Tras 2 días del tratamiento con GA₃ (Fig. 44K), los ovarios presentaron señal en la columela y placenta. En los ovarios de 5 días (Fig. 44L) se vio señal en la columela, mientras que los ovarios de 8 y 10 días no mostraron señal (Fig. 44M-N).

Tabla 26: Resumen de la localización de la señal de expresión del transgén DR5::GUS en ovarios de la línea Dwarf, entre preantesis y 10 días tras antesis polinizados, no polinizados y tratados con GA₃ y 2,4-D.

PREANTESIS	Columela		ANTESIS	Columela	
	Septo			Septo	
	Exocarpio			Exocarpio	
	Mesocarpio			Mesocarpio	
	Endocarpio			Endocarpio	
	Placenta			Placenta	
	Óvulo			Óvulo	
	Haces vasculares			Haces vasculares	
2DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpio				
	Mesocarpio				
	Endocarpio				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
5DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpio				
	Mesocarpio				
	Endocarpio				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
Haces vasculares					
8DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpio				
	Mesocarpio				
	Endocarpio				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
Haces vasculares					
10DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpio				
	Mesocarpio				
	Endocarpio				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
Haces vasculares					

Los ovarios tratados con 2,4-D de 2 días (Fig. 44O) presentaron señal en todos los tejidos, aunque con mayor intensidad en el pericarpo. A los 5 días (Fig. 44P) se vio señal en todos los tejidos excepto en el exocarpo. Al octavo día (Fig. 44Q) hubo señal en todos los tejidos salvo en el exocarpo y placenta. En ovarios de 10 días (Fig. 44R), tras la aplicación de auxinas, se vio señal en la columela, mesocarpo, placenta, calaza, pseudoembrión y haces vasculares.

4. Expresión de *DR5* en la línea *entire*

La línea *DR5::GUS/entire* se evaluó de la misma forma que la línea silvestre (Fig. 45 y Tabla 27).

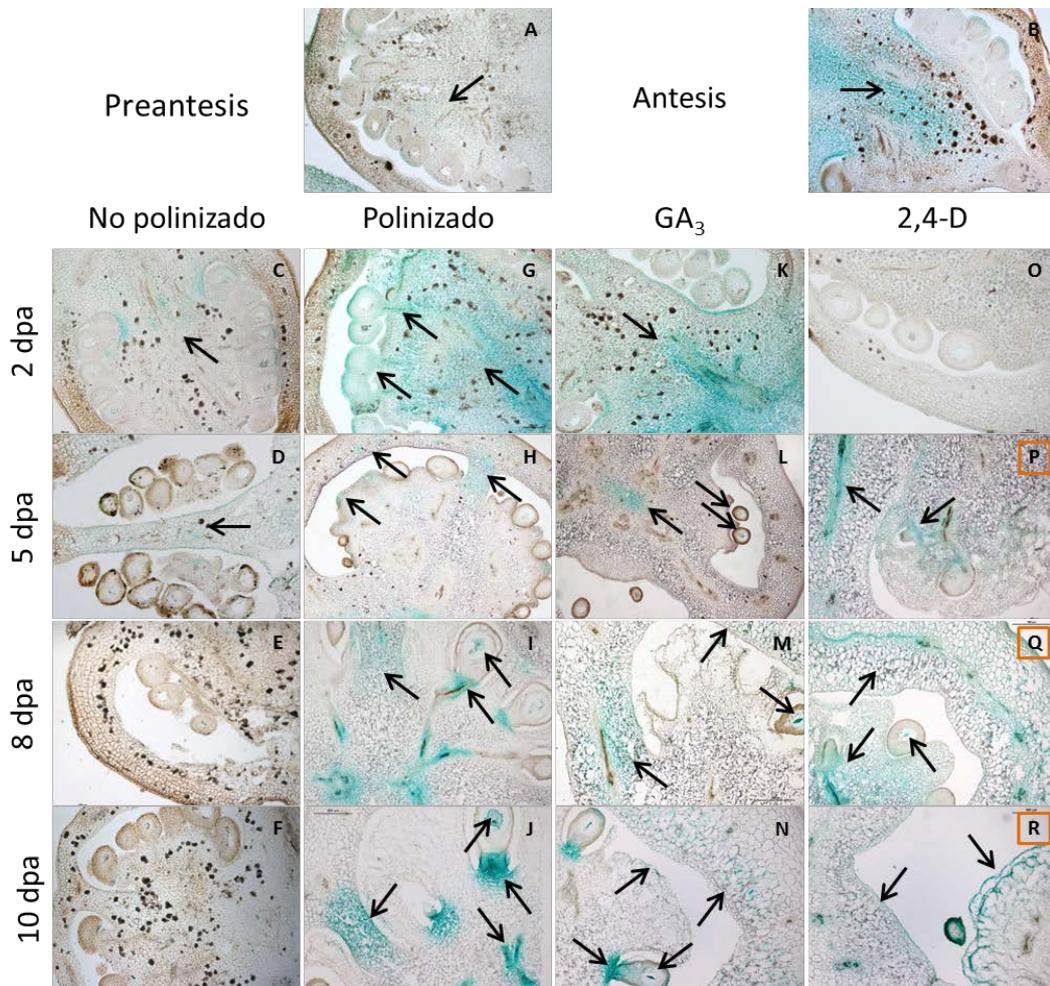


Fig. 45: Patrón de expresión de *DR5* en ovario de la línea *entire* entre preantesis y 10 días tras la antesis.

Las flechas indican la localización de la expresión del transgén *DR5::GUS* en los ovarios de tomate. Las fotos con un recuadro naranja indican que la expresión del transgén se localizó en la mayoría de los tejidos del ovario, indicando con flechas los tejidos más relevantes. Para más detalles ver texto y Tabla 27.

Tabla 27: Resumen de la localización de la señal de expresión del transgén *DR5::GUS* en ovarios de la línea *entire*, entre preantesis y 10 días tras antesis polinizados, no polinizados y tratados con GA₃ y 2,4-D.

PREANTESIS	Columela		ANTESIS	Columela	
	Septo			Septo	
	Exocarpo			Exocarpo	
	Mesocarpo			Mesocarpo	
	Endocarpo			Endocarpo	
	Placenta			Placenta	
	Óvulo			Óvulo	
	Haces vasculares			Haces vasculares	
2DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
	Haces vasculares				
5DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
	Haces vasculares				
8DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
	Haces vasculares				
10DPA	Columela	No polinizado	Polinizado	GA ₃	2,4-D
	Septo				
	Exocarpo				
	Mesocarpo				
	Endocarpo				
	Placenta				
	Calaza				
	Óvulo				
	Embrión				
	Haces vasculares				

Los ovarios en estado de preantesis y antesis (Fig. 45A-B) presentaron señal en la columela.

Los ovarios no polinizados de 2 y 5 días (Fig. 45C-D) mostraron señal en la columela, mientras que en los de 8 y 10 días (Fig. 45E-F) no se vio señal.

Los ovarios polinizados de 2 días (Fig. 45G) tuvieron señal en la columela, placenta y óvulos. Tras 5 días se vio (Fig. 45H) señal en la columela, septos, mesocarpo, placenta, calaza y saco embrionario. Al octavo y décimo día (Fig. 45I-J) los ovarios presentaron señal en los septos, calaza, embrión y haces vasculares.

Tras 2 días de la aplicación de GA₃ (Fig. 45K), los ovarios mostraron señal en la columela y el mesocarpo. En los ovarios de 5 días (Fig. 45L) la señal se localizó en la columela, la placenta y en el interior de los óvulos. A los 8 y 10 días (Fig. 45M-N) se observó señal en los septos, mesocarpo, calaza e interior de los óvulos.

Los ovarios de 2 días tratados con auxinas (Fig. 45O) no presentaron señal. A los 5, 8 y 10 días (Fig. 45P-R) se observó señal en la columela, septos, mesocarpo, placenta, calaza, haces vasculares e interior de los óvulos.

III.B. Análisis del contenido de IAA en el ovario mediante inmunolocalización

Por eso se ha estudiado el patrón de distribución del ácido indolacético (IAA) en el ovario de MT mediante la inmunolocalización de IAA. Se analizaron los siguientes estadios: día de antesis y 1, 3, 5 y 10 días post antesis. Los estadios post antesis se evaluaron en ovarios tanto polinizados como no polinizados. En todos los casos se emascularon las flores 2 días antes de la antesis a fin de evitar la autopolinización.

Al tratarse de un inmunoensayo con señal colorimétrica, la intensidad de color está asociada a la cantidad de auxina presente en el tejido, es decir, a mayor intensidad mayor concentración de hormona.

En la Fig. 46 se muestra la distribución de IAA en ovarios polinizados y no polinizados en distintos estadios de desarrollo.

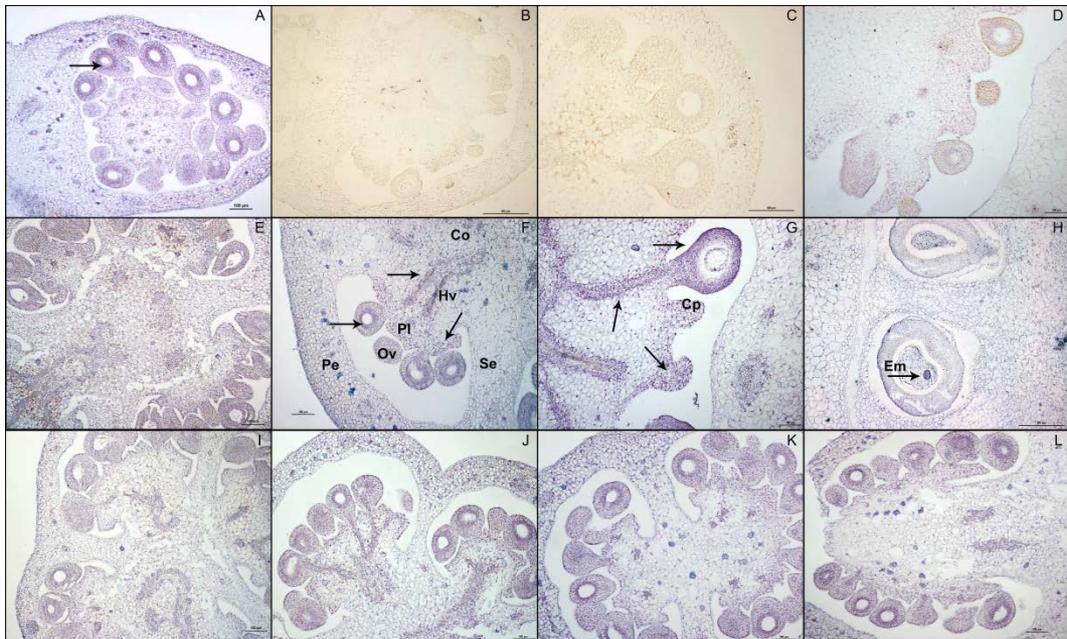


Fig. 46: Inmunolocalización de IAA en distintos estadios de ovarios en desarrollo del ovario de MT.

A) Ovario en antesis. B) Control sin anticuerpo primario (ovario no polinado de 3 días). C) Control sin anticuerpo secundario (ovario polinado de 3 días). D) Control sin fijación de IAA (ovario polinado de 5 días). E-H) Ovarios polinizados de 1, 3, 5 y 10 días. I-J) Ovarios no polinizados de 1, 3, 5 y 10 días. Ov: ovario; Pl: placenta; Hv: haces vasculares; Co: columela; Se: septo; Pe: pericarpo; Cp: cresta placentaria; Em: embrión.

En el estadio equivalente a la antesis se detectó mayor intensidad de señal en los óvulos y, a su vez, presentó una señal uniforme en el resto de tejidos del ovario (Fig. 46-A).

Los niveles de concentración de IAA descendieron en los ovarios no polinizados de 1 día (Fig. 46-I). Sin embargo, la polinización provocó en un aumento de IAA en todos los tejidos del ovario (Fig. 46-E).

A los 3 días, la diferencia de tamaño entre los ovarios polinizados y emasculados se hizo evidente. En los polinizados se observó un aumento de señal en los haces vasculares

(Fig. 46-F), mientras que en los no polinizados fueron iguales a los ovarios no polinizados de 1 día (Fig. 46-J).

En ovarios polinizados de 5 días la señal aumentó en haces vasculares, óvulos y crestas placentarias respecto a los ovarios de 1 y 3 días. También se observó señal en los haces vasculares del pericarpo del ovario. El resto de los tejidos del ovario presentó una señal más baja (Fig. 46-G). Los ovarios no polinizados de 5 días no presentaron diferencias respecto a los ovarios de 1 y 3 días.

10 días después de la polinización, los ovarios tenían una señal muy intensa en el embrión, siendo el tejido del ovario con mayor intensidad de color. El resto de tejidos mostró una señal baja. Los ovarios no polinizados de la misma edad no se desarrollaron, confirmando la ausencia de partenocarpia facultativa de MT. La señal de IAA no difirió del resto de estadios emasculados, mostrando color en todos los tejidos de forma dispersa.

La polinización provocó un rápido aumento del contenido de IAA en todos los tejidos del ovario. La señal se incrementó en los haces vasculares que nutren a los óvulos tras 3 días de la polinización y a los 5 días se intensificó. Los óvulos y las crestas placentarias tuvieron la señal más alta al quinto día de la polinización. A los 10 días se observó una señal muy intensa en el embrión, siendo el tejido del ovario con mayor intensidad, mientras que el resto de tejidos mostró una señal baja.

Los resultados obtenidos indican que las auxinas no desaparecen de los tejidos del ovario aunque no ocurra la polinización, pero que sus niveles son bajos y la distribución es homogénea en los diferentes tejidos.

Discusión

Fenotipo de Micro-Tom (MT) y mutantes hormonales

MT es una planta modelo debido a su rápido crecimiento y baja estatura (Scott & Harbaugh 1989). Además presenta crecimiento y desarrollo partenocárpico del fruto en respuesta a la aplicación de giberelinas (GAs) y auxinas, similar al descrito en cultivares de tomate no enanos (Serrani, Fos, et al. 2007).

Se dispone de mutantes de MT cuasi-isogénicos, obtenidos mediante introgresión, de genes relacionados con el metabolismo y modo de acción de diversas hormonas (Carvalho et al. 2011) (para más información visitar <http://www.esalq.usp.br/tomato/index.html>). De estos mutantes, para nuestro trabajo se seleccionaron *procera* (que presenta baja respuesta a GAs), *Dwarf* (que posee niveles normales de BR), *dgt* y *entire* (que muestran alterada la respuesta a auxina). Junto a estos mutantes utilizamos la línea transgénica *CsGA20ox1* (García-Hurtado et al. 2012) (que sobreexpresa un gen de biosíntesis de GAs).

La línea MT y los mutantes *35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *Dwarf/35S::CcGA20ox1*, *dgt* y *entire*, se compararon simultáneamente con objeto de analizar las diferencias fenotípicas provocadas por la presencia de dichas mutaciones. De la misma forma, se analizó si la introducción de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* o *DR5::GUS* alteraba el fenotipo de las líneas mutantes originales. La introducción de estos transgenes se realizó mediante cruce dirigido en el invernadero y, posteriormente, se obtuvieron las líneas dobles homocigotas. Es de destacar que la caracterización de todas las líneas, tanto de los mutantes originales como de las dobles homocigotas, se realizó al mismo tiempo en el invernadero, y no por separado (como ha sido hecho por otros autores).

El fenotipo de las líneas que encontramos (ver Resultados I) fue esencialmente igual al descrito por otros autores (Bassel et al. 2008; Carrera et al. 2012; García-Hurtado et al. 2012; Wang et al. 2005; Oh et al. 2006; Carvalho et al. 2011; Bishop et al. 1999). En particular, comparada con MT, es de destacar la mayor altura y partenocarpia de las líneas *35S::CcGA20ox1* y *procera*, el incremento de altura y complejidad de la hoja de *Dwarf*, la baja estatura y las hojas curvadas de *dgt* y las hojas simples de *entire*.

Cuando se compararon los 17 fenotipos vegetativos y reproductivos analizados de las líneas, y se ordenaron éstas de mayor a menor número de fenotipos parecidos a MT (ver Tabla 28), se encontró que la más parecida al fenotipo silvestre (MT) fue *dgt*, que compartió 10 características. Vienen después *Dwarf* con 7; *entire* con 6; las líneas *35S::CcGA20ox1* y *procera*, ambas con 4, y, *Dwarf/35S::CcGA20ox1* con 3.

Los fenotipos más constantes entre MT y los mutantes *35S::CcGA20ox1*, *Dwarf*, *Dwarf/35S::CcGA20ox1*, y *dgt* fueron la relación de la longitud pistilo/cono y el área de pétalos/sépalos, donde todas las líneas fueron iguales. Las excepciones fueron *procera* (que posee pistilo exerto; ver Carrera et al. 2012) y *entire* (que posee sépalos de menor tamaño). En general, las características florales fueron más constantes que las vegetativas

entre las líneas, lo que sugiere que el control del desarrollo floral es más fuerte (menos plástico) que el desarrollo vegetativo. Por el contrario, las características más variables entre las líneas fueron la altura y el número de hojas, ya que en ninguna línea estos fenotipos fueron iguales a los de MT. Esto indica que las características vegetativas están controladas por un balance hormonal entre, al menos, las hormonas GAs, BR y auxinas, todas ellas representadas en los mutantes analizados.

Tabla 28: Resumen de las diferencias significativas existentes entre MT y sus mutantes para las diferentes características fenotípicas evaluadas.

Las distintas letras indican que los datos son significativamente diferentes entre ellos (mediante estudio estadístico ANOVA para $p < 0,05$). L. cono est., longitud cono estaminal; Pistilo/cono, relación longitud pistilo/cono; Pétalos/sépalos, relación áreas pétalos/sépalos% P natural, % partenocarpia natural; % P em, % partenocarpia tras emasculación; N° pétalos/flor, número medio de pétalos por flor.

Característica	MT	35S::CcGA20ox1	procera	Dwarf	Dwarf/35S::CcGA20ox1	dgt	entire
Altura	a	b	c	d	e	f	g
Diámetro tallo	ab	cd	ac	ab	d	d	b
Longitud hoja	ab	b	c	d	e	a	bc
N° foliolos	a	a	a	b	c	a	d
Ancho hoja	a	bc	ab	f	e	c	d
N° hojas	a	de	d	e	e	b	c
N° flores	ab	cd	d	b	ac	acd	d
Antesis (días)	a	b	b	a	b	b	b
Área sépalos	a	b	b	b	c	a	b
Área pétalos	a	b	b	c	d	a	a
L. cono est.	a	b	b	c	d	e	e
Longitud pistilo	a	b	c	c	d	e	e
Pistilo/cono	ab	b	c	a	b	ab	b
pétalos/sépalos	abc	cd	bc	a	ab	bc	d
% P. natural	a	b	c	ab	d	a	ab
% P. em.	a	b	d	ab	c	ab	ab
N° pétalos/flor	a	c	d	b	b	a	c

Las líneas 35S::CcGA20ox1 y procera fueron muy parecidas entre ellas, compartiendo características fenotípicas asociadas al aumento del contenido de GAs, en particular mayor altura y capacidad partenocárpica. Sin embargo, la tasa de partenocarpia fue mucho menor en 35S::CcGA20ox1 (ver Resultados I, Tablas 11 y 12). El fenotipo de ambas es parecido y la sobreexpresión de GAs se asemeja a la mutación procera, aunque no es idéntica. Esto indica que la sobreexpresión de GAs representada por la línea 35S::CcGA20ox1 no puede sustituir por completo al mutante procera en los estudios de señal y respuesta de GAs.

Dwarf floreció al mismo tiempo que MT, tuvo más hojas y no presentó partenocarpia. Esto muestra que el crecimiento vegetativo de Dwarf es más rápido que el

de MT y que la baja capacidad partenocárpica de MT no aumenta en presencia de BR. Por tanto, cabe concluir que el uso del mutante *Dwarf* frente a MT podría ser ventajoso, ya que no presenta bajo contenido de BR comparado con MT, una razón que ha puesto en cuestión los resultados sobre fructificación obtenidos con MT por algunos autores.

Como se ha mencionado anteriormente, *Dwarf* y *35S::CcGA20ox1* fueron más altos y *35S::CcGA20ox1* mostró más partenocarpia que MT. Hemos encontrado que el híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* es más alto que las líneas individuales y que posee una tasa de partenocarpia del 75%, frente al 28% y 16% de *35S::CcGA20ox1* y *Dwarf*, respectivamente. Esto muestra un efecto sinérgico de las GAs y de los BR en estos fenotipos. Se ha descrito que la aplicación de BR potencia el efecto de las GAs cuando se aplican conjuntamente en plántulas de MT (Martí et al. 2006). Sin embargo, no existen referencias previas a un efecto similar sobre la partenocarpia.

El mutante *entire*, sorprendentemente, no presentó cambios significativos en la capacidad partenocárpica (ver Tablas 11 y 12 de Resultados I), en nuestras condiciones de cultivo, a pesar de haberse descrito que plantas de Ailsa Craig que expresan *AsIAA9* muestran partenocarpia (Wang et al. 2005). Esta aparente contradicción puede ser debida al hecho de que estos autores utilizaron un cultivar diferente y tecnología antisentido para anular la expresión del gen. En nuestro caso, el cambio fenotípico más significativo fue el incremento del número de pétalos de la flor, incluso mayor que el que se encuentra en *procera* (Carrera et al. 2012).

En nuestro estudio comprobamos que la introducción de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* o *DR5::GUS* en MT, como en sus mutantes, no alteró el fenotipo de las líneas (ver Tablas 7, 8, 9, 13 y 14 de Resultados I). Esto indica que la colección de líneas transgénicas generadas puede utilizarse en estudios de expresión de los transgenes, al no estar afectados los fenotipos por la presencia de dichos transgenes. Estas líneas pueden utilizarse indistintamente para estudios de expresión y fenotipado.

Regulación hormonal de la ramificación

El patrón de ramificación es el resultado de la regulación espacio-temporal del crecimiento de las yemas axilares, en cuya regulación participan factores ambientales y genéticos. La arquitectura de la planta está definida principalmente por la ramificación y responde a la adaptación de las plantas al medio que les rodea. El análisis fenotípico de nuestra colección de mutantes de MT puso de manifiesto el papel de diversas hormonas en la ramificación (un objetivo no previsto inicialmente).

Se ha observado anteriormente que la aplicación de GAs y la ausencia de la proteína DELLA (en el mutante *procera*) producen un patrón de ramificación anormal (Bassel et al. 2008; Lombardi-Crestana et al. 2012; Martinez-Bello et al. 2015). Por eso, en este trabajo hemos llevado a cabo un estudio exhaustivo de la ramificación en el tiempo y según la posición de la yema axilar, además de considerar la longitud final de los brotes laterales, en la colección de líneas mutantes disponible.

La ramificación en MT comenzó a partir de la quinta semana después de la siembra y, aunque el desarrollo de brotes axilares inferiores (en las yemas 1ª y 2ª) fue más lento, alcanzó el 100% en todas las yemas axilares a la novena semana. Las líneas *35S::CcGA20ox1* y *procera* mostraron un retraso en el inicio de la ramificación y no desarrollaron brotes axilares en las 3 yemas inferiores. Por el contrario, en la línea *Dwarf* se encontró un adelanto en el inicio de ramificación, y que todas las yemas axilares tenían brotes (100% de ramificación). Por otro lado, el híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1* tampoco completó la ramificación tras las nueve semanas de análisis, aunque a los 90 días después de la siembra, momento en el que se midió la longitud de los brotes laterales, *Dwarf/35S::CcGA20ox1* había desarrollado los brotes inferiores. Estos resultados sugieren que mientras las GAs reprimen la ramificación, posiblemente a través de DELLA (que actuaría como inductora), los BR la aumentan, pudiendo llegar a contrarrestar el efecto represor de las GAs.

La ramificación del mutante *dgt* fue un 60% inferior que MT y el desarrollo de los brotes axilares fue muy escalonado en sentido apical-basal. Estudios anteriores han descrito al mutante *dgt* como deficiente en la formación de raíces laterales (Balbi & Lomax 2003; Oh et al. 2006). En el doble mutante *Rg1/dgt*, que revierte el fenotipo *dgt*, se observó acumulación de *SIPIN4* (Lombardi-Crestana et al. 2012), que es el *PIN* más expresado en tomate, y su supresión genera un fenotipo similar a *dgt* con alteraciones en el desarrollo de brotes axilares (Pattison y Catalá 2012). Las auxinas son necesarias para el desarrollo de los brotes axilares y según el modelo de canalización de auxinas, el transporte de auxinas desde la yema axilar hacia el tallo, mediado por los *PIN*, es necesario para el desarrollo del brote axilar (Rameau et al. 2015). Esto sugiere que el mutante *dgt* no desarrolla con normalidad los brotes laterales debido a una posible deficiencia de *PIN4*.

Por otro lado, la ramificación de *entire* fue basipétala, aunque líneas antisentido de *IAA9* han sido descritas con un patrón de ramificación acropétala (Wang et al. 2005). La diferencia de ramificación entre *entire* y líneas antisentido de *IAA9* puede deberse a que los estudios han sido realizados con diferentes cultivares de tomate (MT y Ailsa Craig, respectivamente), y a que el efecto de la expresión antisentido de *IAA9* sea distinto al de la mutación *entire*. La regulación negativa de *IAA9* aumenta la sensibilidad a auxinas, promueve la elongación de la raíz principal y el aumento de raíces secundarias (Wang et al. 2005), lo que sugiere que la proteína silvestre *IAA9* es un inhibidor de la ramificación.

Expresión de *pSIGA20ox1* durante la fructificación utilizando *GUS* como gen delator

La fructificación produce un incremento de auxinas en el ovario, que inducen a su vez un aumento del contenido de GAs activas a través de la regulación positiva de expresión de genes de biosíntesis de GAs. Entre estos, se ha demostrado que la expresión del gen *SIGA20ox1* es esencial en el proceso de la fructificación en tomate (Serrani, Sanjuán, et al. 2007; Serrani et al. 2008).

Para conocer si el aumento de expresión *SIGA20ox1* durante la fructificación está localizado en determinados tejidos o células del ovario, se introdujo en homocigosis el transgén *pSIGA20ox1::GUS* en MT y se analizó la expresión de *GUS* en ovarios no polinizados y polinizados. Además, para conocer el efecto de distintas hormonas en dicha expresión, se introdujo el transgén en las líneas mutantes *35S::CcGA20ox1*, *procera*, *Dwarf*, *dgt* y *entire* y se analizó el efecto de la aplicación de GA₃ y 2,4-D en todas las líneas obtenidas.

En MT no se observó señal de *GUS* en ovarios no polinizados en ningún estado de desarrollo (hasta el día 10 después de antesis). *35S::CcGA20ox1* y *procera* mostraron señal en la placenta entre los estadios de preantesis y 2 días después de antesis, y en *procera* también 5 días después. Esto indica que la partenocarpia propia de estas líneas (en ausencia de polinización) se debe a la expresión de *SIGA20ox1* en la placenta (que es por lo tanto el lugar donde tendría lugar la síntesis de GAs activas). También se vio señal de *GUS* en la placenta en *Dwarf* y *dgt* en preantesis, confirmando que la placenta es un lugar de síntesis de GAs en estadios iniciales de desarrollo del ovario, en ausencia de fecundación de los óvulos. En los ovarios no polinizados no se observó, en ningún estadio de ninguna línea, señal en los óvulos.

En ovarios polinizados de MT se encontró señal de *GUS* a partir del día 8 después de antesis en el saco embrionario y en el embrión. Una expresión similar se observó en el resto de las líneas analizadas. Esto sugiere que la síntesis de GAs tras la polinización tiene lugar en el óvulo fecundado, específicamente en el saco embrionario y embrión. Tras la polinización también se observó señal en la placenta en todas las líneas, aunque a tiempos diferentes. Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Serrani et al. (2008), que mediante PCR semicuantitativa encontraron un ligero aumento de expresión de *GA20ox1* en ovarios enteros 5 días después de la polinización, y en semillas y pericarpo de ovarios de 10 días. En nuestro caso, la ausencia de expresión *GUS* en el pericarpo puede deberse a una baja señal en el mismo o a un efecto de dilución que no permitió su visualización con *GUS*. Es interesante que en algunos casos la señal de la placenta era más intensa en la zona más próxima al óvulo. Esto sugiere que el embrión es una fuente de GAs y que éstas, o una señal derivada de ellas, se exportan vía funículo hacia el resto del fruto como señal inductora del desarrollo de la placenta, mediante la síntesis de GAs, para estimular el crecimiento del fruto y rellenar la cavidad locular.

La polinización de ovarios de *procera* indujo expresión de señal de *GUS* en el ovario a partir del día 8, y en *35S::CcGA20ox1* desde el día 2. Este aumento de señal en las líneas *procera* y *35S::CcGA20ox1* fue inesperado, dado que la expresión de *SIGA20ox1* presenta retroalimentación negativa en tejidos vegetativos de MT (Martí et al. 2010). Es posible por lo tanto que el control por retroalimentación en ovarios pueda ser distinto al que tiene lugar en tejidos vegetativos.

Tras la aplicación de GA₃ en MT no se observó señal de *GUS*, de acuerdo con lo esperado por el efecto de retroalimentación negativa de la ruta de las GAs. Pero en ovarios *35S::CcGA20ox1* aumentó, y en *procera* se encontró un ligero aumento de señal,

de acuerdo con los resultados inesperados en ovarios tras la polinización. Por tanto, cabe concluir que las GAs aumentan la expresión del transgén en el ovario (y por tanto de *SIGA20ox1*), contrariamente a lo esperado.

El tratamiento con auxina (2,4-D) no indujo la expresión del transgén en MT, contrastando con el aumento de expresión de *SIGA20ox1* encontrado previamente en ovarios tratados con 2,4-D (Serrani, Sanjuán, et al. 2007). Sin embargo, dicho tratamiento aumentó la expresión en el resto de las líneas analizadas. Esto indica que la construcción del transgén utilizado es capaz de responder a la presencia de auxinas. Esta aparente contradicción se analizará en el apartado siguiente, donde discutiremos la regulación de expresión de *SIGA20ox1* mediante localización *in situ*.

Tanto *35S::CcGA20ox1* como *procera* mostraron señal de GUS en ovarios no polinizados, pero en *procera* se prolongó más en el tiempo, asociada a la mayor capacidad partenocárpica de *procera* frente a *35S::CcGA20ox1*. El efecto de la polinización y los tratamientos hormonales sobre la transcripción de *pSIGA20ox1::GUS* en *35S::CcGA20ox1* es mucho mayor que en *procera*. Es decir, que la sobreexpresión de *CcGA20ox1* y la mutación *procera* no tienen el mismo efecto sobre la ruta de biosíntesis de GAs, aunque el resultado sobre el fenotipo es similar.

En ovarios *Dwarf* se vio señal de GUS en la placenta en preantesis, y tanto con la polinización como con los tratamientos, mostraron más señal que en MT. Esto indica que los BR aumentan la expresión de GAs interviniendo en la regulación de la biosíntesis de GAs, posiblemente actuando de modo sinérgico con las auxinas.

La línea *dgt* mostró un aumento de señal en ovarios polinizados y tratados con auxinas. En ovarios *entire* presentó señal en antesis, que puede estar relacionada con la capacidad partenocárpica descrita de esta línea. Esto sugiere que la proteína no mutada inhibe la síntesis de GAs de forma directa o indirecta.

Expresión de *SIGA20ox1* durante la fructificación mediante hibridación *in situ*

El análisis de expresión de *SIGA20ox1* obtenidos mediante *GUS* es indirecto. Por ello decidimos llevar a cabo el análisis de dicha expresión mediante localización *in situ* de los transcritos. En este caso se realizó solo en ovarios no polinizados y polinizados en distintos estadios de desarrollo, entre preantesis y 10 días después de la antesis.

Como se ha descrito en Resultados II.B, la alta homología de los genes de la familia *GA20ox* dificulta la detección específica de los mismos. También comentamos las dificultades técnicas encontradas con los tejidos tomate, sobre todo en ovarios de estadios avanzados. Para resolver el primer problema se encontraron dos zonas de la secuencia de *SIGA20ox1* de alta especificidad y con ellas se realizaron diversas pruebas,

llegando a la conclusión de que la visualización óptima de señal se conseguía usando una mezcla de las dos sondas diseñadas.

En preantesis se encontró expresión de *SIGA20ox1* en todos los tejidos del ovario, pero especialmente en los óvulos (no fertilizados), placenta y haces vasculares. Esto apoya la hipótesis de que las GAs están implicadas en el crecimiento del ovario hasta el momento de la polinización. Es interesante señalar que, sin embargo, en el estadio equivalente a la antesis (día 0), no se vio señal en ovarios no polinizados, sugiriendo que en ese estado el ovario está en reposo (Gillaspy et al. 1993), y que la síntesis de GAs no es necesaria. No se observó tampoco señal posteriormente en ovarios no polinizados.

Como hemos dicho, los ovarios no polinizados, hasta el día 10, no expresaron *SIGA20ox1*. Por el contrario, en los ovarios polinizados se observó señal en todos los estadios analizados. La señal fue visible a los 3 y 5 días después de la polinización en la placenta y los óvulos en crecimiento. A los 5 y 10 días se puso de manifiesto especialmente en el embrión en desarrollo, permaneciendo una leve señal en el resto de los tejidos. Estos resultados coinciden con el aumento de expresión de *SIGA20ox1* detectado tras la polinización en óvulos enteros (Serrani, Sanjuán, et al. 2007), e indican que la expresión de *SIGA20ox1* está implicada en el desarrollo embrionario.

Los resultados obtenidos *in situ* difieren de los obtenidos mediante *GUS* (discutidos en el apartado anterior), donde no se observó señal en preantesis, ni en polinizados hasta el día 10 (también en el embrión y saco embrionario). Esto sugiere que la técnica *in situ*, a pesar de su mayor dificultad, es preferible a la detección mediante la señal de *GUS*, ya que presenta mayor sensibilidad y es una medida directa de la expresión génica.

La aplicación de 2,4-D mostró baja expresión *in situ* en todos los tejidos del ovario, pero más intensa en el pseudoembrión. Se ha descrito que la aplicación de auxinas estimula el desarrollo de la estructura del pseudoembrión (Serrani, Fos, et al. 2007), y se ha sugerido que puede jugar un papel importante en la fructificación por auxinas. Los resultados apuntan a que pueden ser una fuente de síntesis de GAs. La falta de visualización de expresión en el pseudoembrión mediante la tinción *GUS*, confirma la menor sensibilidad de esta técnica.

Cabe concluir que todos los tejidos del ovario son capaces de expresar *SIGA20ox1*, como se muestra al aplicar 2,4-D. Esto sugiere la existencia de una señal, tras la fertilización del óvulo, que induce la expresión de *SIGA20ox1* en el óvulo. La expresión del gen en la placenta puede ser inducida por la misma que en el óvulo, o bien por otra procedente del óvulo tras su fertilización.

Localización de IAA durante la fructificación utilizando la expresión de *DR5*

Se sabe que tras la polinización tiene lugar un aumento del contenido de auxina en el ovario, que induce la síntesis de GAs a través de una mayor expresión de *GA20ox*

(Serrani et al. 2008). Con objeto de localizar donde se encuentran las auxinas en el ovario tras la polinización, y tras la inducción de fructificación mediante aplicación de GA₃ o 2,4-D, se ha estudiado la expresión de *DR5* utilizando *GUS* como gen marcador (medida indirecta de la presencia de auxina). Los análisis se realizaron en MT y diversas líneas mutantes.

En ovarios MT en preantesis (no polinizados) se observó señal de GUS en columela, endocarpo y óvulos. En el caso de *entire* (mutante de *SIIAA9*) se encontró señal en la columela. Esto sugiere que las auxinas, como ocurre con las GAs, son necesarias para completar el desarrollo del ovario antes de antesis. La señal en *entire* se mantuvo desde preantesis hasta 5 días más tarde. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que *SIIAA9* está relacionado con la represión del desarrollo partenocárpico del ovario (Wang et al. 2005; Wang et al. 2009) y *SIIAA9* actuaría como un represor de la respuesta a auxinas.

La polinización indujo la expresión de *DR5* en MT, *Dwarf* y *entire* desde el día 2 hasta el día 10 después de antesis. Dicha expresión se localiza principalmente en funículo, saco embrionario y embrión. Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos por Pattison y Catalá (2012), que observaron expresión de *DR5::GUS* y *DR5rev::mRFP* en ovarios de Ailsa Craig. Nuestros resultados apoyan la teoría de éstos autores, donde el óvulo fecundado es una fuente de auxinas, las cuales son transportadas por el funículo, promoviendo el crecimiento de la capa externa de la placenta que rodea a los óvulos.

La aplicación de GA₃ no indujo señal de GUS en MT, pero si en *Dwarf* y *entire* desde el día 2, particularmente en *entire*. Esto indica que las GAs potencian o inducen la síntesis o respuesta a auxinas, sobre todo en *entire*. Lo que implica la regulación mutua de la expresión entre las auxinas y las GAs, sugiriendo que el equilibrio entre ambas hormonas es esencial para el correcto desarrollo del fruto.

La mayor respuesta de *DR5* a GA₃ en *Dwarf*, comparada con MT, muestra que existe un efecto sinérgico entre GAs y BR en la expresión de *DR5* durante la fructificación. Este efecto es similar al descrito anteriormente en plántulas de tomate por Martí et al. (2006). Nuestros resultados sugieren que los BR y *SIIAA9* son conectores entre las rutas de GAs y auxinas: mientras que los BR actuarían como activadores de las auxinas en presencia de GAs, *SIIAA9* sería un represor de auxinas en presencia de las GAs.

Como era de esperar, la aplicación de 2,4-D indujo la expresión de *DR5* en MT, *Dwarf* y *entire* de forma generalizada, aunque ligeramente inferior en *entire*.

Inmunolocalización de IAA en el ovario durante la fructificación

La expresión de *DR5* es un método indirecto de análisis del contenido o respuesta a auxinas. Por ello se estudió también el patrón de distribución de IAA endógeno mediante

la inmunolocalización de IAA en ovarios no polinizados y polinizados en distintos estadios, desde antesis a 10 días tras la antesis.

Resultados previos han demostrado la importancia de las auxinas en la fructificación de tomate. En primer lugar, la aplicación exógena induce la formación de frutos partenocárpicos (Serrani, Fos, et al. 2007). El mismo resultado se ha obtenido mediante la expresión en el ovario de genes bacterianos de la ruta de biosíntesis de auxinas (Rotino et al. 1997; Acciarri et al. 2002; Carmi et al. 2003) o impidiendo el transporte de auxinas en ovarios no polinizados (Serrani et al. 2010). En segundo lugar, existe un incremento de auxinas en el ovario tras la fertilización (De Jong et al. 2009). En este sentido, se ha descrito que hay mayor concentración de IAA en las semillas que en el resto de los tejidos del ovario (Varga y Bruinsma 1976; Mapelli et al. 1978; Devoghalare et al. 2012; Pattison y Catalá 2012)

Frente a los resultados anteriores, la inmunolocalización de IAA realizada en este trabajo (detección directa en el tejido ovárico) proporciona una información nueva y relevante, para el entendimiento del proceso de fructificación, ya que ha permitido caracterizar los tejidos o células donde se localiza la máxima concentración de auxinas y los gradientes de concentración.

En ovarios no polinizados se encontró una señal generalizada de inmunolocalización de IAA desde antesis hasta 10 días después. Fue particularmente intensa en antesis y en los óvulos. Este resultado, junto al obtenido por Zhang et al. (2011) mediante inmunoensayo de que en algodón es necesaria una alta acumulación de IAA en las células epiteliales del óvulo en antesis para la correcta formación de fibras de algodón, sugiere que el IAA participa en la correcta formación del epitelio del óvulo para su futuro desarrollo.

Varios estudios han concluido que los integumentos de los óvulos participan en el crecimiento del fruto. Es el caso del mutante partenocárpico de *Arabidopsis fruit without fertilization (fwf; arf8-4)*, incrementa el desarrollo de frutos partenocárpicos en presencia de la mutación *aberrant testa shape (ats)*, que presenta un único integumento en el óvulo (Goetz et al. 2006; Vivian-Smith et al. 2001). Pattison y Catalá (2012), por otra parte, observaron mediante el uso de plantas transgénicas de tomate con la construcción *DR5rev::mRFP_{er}*, una fuerte señal en los integumentos del óvulo desde 6 días antes de antesis hasta antesis, apoyando la hipótesis de que las auxinas están involucradas en el correcto desarrollo de los integumentos y del saco embrionario anterior a la antesis.

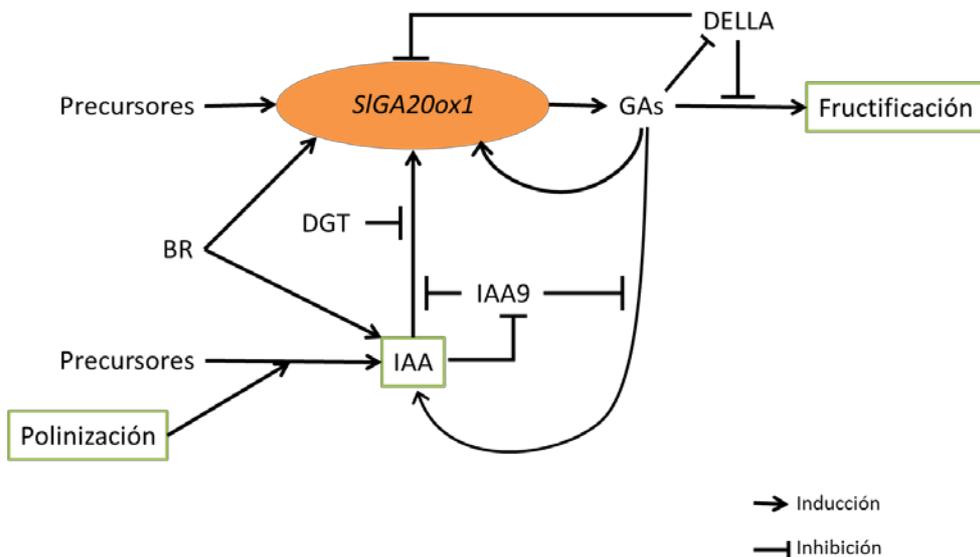
En ovarios de 1 día tras la polinización hemos encontrado mediante inmunoensayo un aumento de IAA en todos los tejidos del ovario. A los 3 días se intensificó la señal en los haces vasculares que nutren a los óvulos. Los ovarios de 5 días presentaron señal especialmente en las crestas de la placenta. Pattison y Catalá (2012), utilizando GC-MS, concluyen que los niveles de IAA en ovarios polinizados de 5 días, son similares en el pericarpo y en los tejidos internos. En nuestro caso, tras 10 días se observó una señal muy intensa localizada en el embrión. Puede concluirse que las auxinas no desaparecen de los

tejidos de ovarios no polinizados, y que su contenido aumenta rápida y significativamente tras la polinización

La señal obtenida mediante inmunolocalización es mucho más intensa y clara que la obtenida mediante la expresión de *DR5* y el gen reportador *GUS*. Esto muestra que la técnica de inmunolocalización es más sensible que la detección mediante tinción de *GUS*, igual que ocurre con los resultados discutidos antes referentes al análisis de la expresión de *SIGA20ox1*.

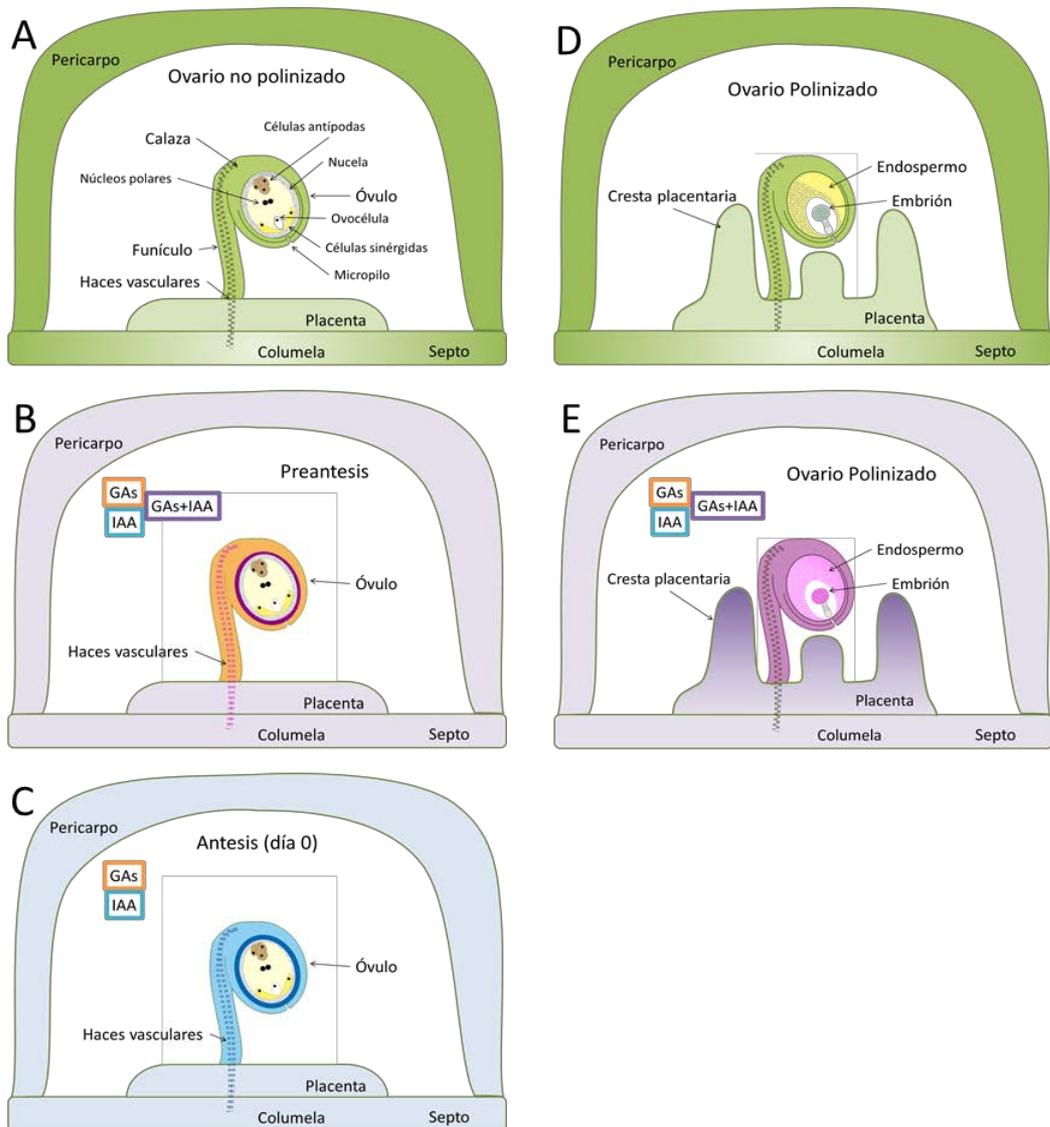
Modelo propuesto de la regulación de la transcripción del gen *SIGA20ox1* durante la fructificación y localización espacial de GAs e IAA

En resumen, proponemos un modelo de la regulación del gen *SIGA20ox1* durante la fructificación basado en los resultados obtenidos mediante la localización de la expresión de los transgenes *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS*, hibridación in situ del gen *SIGA20ox1* e inmunolocalización de IAA en el ovario (Figs 47 y 48).



En ovarios no polinizados en estadios previos a la antesis (Fig. 48A-B), los transcritos de *SIGA20ox1* y el IAA se localizan fundamentalmente en los óvulos. Las proteínas DELLA inhiben la fructificación, impidiendo la señalización de las GAs, así como de la transcripción de *SIGA20ox1* en el ovario, principalmente en la placenta. Las proteínas DGT y IAA9

inhiben la respuesta a IAA en placenta y columela, respectivamente. Esto indica que ambas proteínas son inhibidoras indirectas de la transcripción del gen *SIGA20ox1* y de la fructificación.



En estadio de antesis (Fig. 48C), no se localizan transcritos de *SIGA20ox1* en los tejidos, mientras que el IAA se localiza en todo el ovario, aunque con más intensidad en los óvulos, y especialmente en los integumentos. En este estadio, la proteína IAA9 estaría localizada, principalmente, en la columela e inhibiría la respuesta a auxinas y la transcripción de *SIGA20ox1* en dicho tejido.

Tras la polinización (Fig. 48D-E), los niveles de IAA aumentan en todos los tejidos del ovario, especialmente en placenta, óvulos y embrión. El IAA induce la transcripción del gen de síntesis de GAs *SIGA20ox1*, especialmente en placenta, óvulos y embrión, incrementando el contenido de GAs activas e induciendo la fructificación (Fig. 47). El aumento de GAs en el ovario induce la transcripción de *SIGA20ox1*, a través de la inhibición de la proteína DELLA, así como la inducción de síntesis o respuesta auxinas en el ovario. Esta interacción entre ambas hormonas estaría regulada, al menos en parte, por la proteína IAA9, que tendría un efecto inhibitorio del efecto de las GAs sobre las auxinas.

Por otro lado, los BR inducen la transcripción de *SIGA20ox1* en el ovario, principalmente en la placenta, óvulos y embrión. Los BR también inducen un aumento del contenido, o de respuesta, de IAA en la placenta, calaza y embrión. Por lo tanto, tienen un efecto sinérgico con GAs y auxinas en el ovario, principalmente en la placenta.

Conclusiones

1. Las líneas transgénicas homocigotas generadas en este estudio, en las que se ha introducido el transgén *pSIGA20ox1::GUS* en el cultivar Micro-Tom (MT) de tomate y diversos mutantes hormonales (*procera*, *35S::CcGA20ox1 Dwarf*, *dgt* y *entire*), no difieren fenotípicamente de las líneas originales. Esta colección de líneas constituye una herramienta útil para futuros estudios, tanto fenotípicos como de expresión de *SIGA20ox1*.
2. La introducción del gen silvestre *Dwarf* en MT (que normaliza su contenido en brasinosteroides, BR) aumenta la altura de la planta pero no prolonga la duración de su ciclo vegetativo ni aumenta la capacidad partenocárpica de MT. Esto hace que MT-*Dwarf* presente la ventaja de que los resultados obtenidos no serían cuestionados por la ausencia de BR en MT.
3. El incremento de la altura, y la mayor expresión de *pSIGA20ox1::GUS* en el mutante *Dwarf* y el híbrido *Dwarf/35S::CcGA20ox1*, sugieren la existencia de sinergia entre GAs y BR.
4. Las GAs inhiben el desarrollo de los brotes laterales en sentido basal-apical, mediado por la proteína DELLA. El efecto inhibitorio es revertido, al menos parcialmente, por BR.
5. La localización de la expresión de *SIGA20ox1* en el ovario mediante el gen delator *GUS* no se visualizó hasta el día 8 después de antesis. Por el contrario, la técnica de hibridación in situ permitió la visualización de la expresión de *SIGA20ox1* desde preantesis hasta 10 días después de antesis. Estos resultados, junto al hecho de que la localización mediante hibridación in situ es directa, supone una clara ventaja de esta técnica frente al uso del gen delator *GUS*.
6. Los transcritos de *SIGA20ox1* se localizaron tras la polinización, mediante señal de *GUS* e hibridación in situ, principalmente en la placenta, óvulo y embrión. La aplicación de GAs produjo, en general, un aumento inesperado de la señal de *GUS*, mientras que con las auxinas se observó, mediante hibridación in situ, una baja transcripción, pero uniforme en todos los tejidos del ovario.
7. La polinización indujo la expresión de *DR5* (marcador de la respuesta a auxina) desde el día 2 hasta el día 10, principalmente en funículo, saco embrionario y embrión. La aplicación de GA3 en ovarios MT-*Dwarf*, intensifica la señal de *DR5* respecto de MT, sugiriendo la existencia de un efecto positivo entre las GAs y los BR sobre la expresión de *DR5*.
8. La señal de IAA obtenida mediante inmunolocalización es más intensa y clara que la expresión de *DR5* mediante *GUS*. Supone por lo tanto una clara ventaja frente a esta última técnica, además de ser un método directo de determinación de IAA.
9. La señal encontrada en ovarios en preantesis sugiere que las auxinas y las GAs son necesarias para el correcto desarrollo del ovario antes de la antesis.

10. La colocalización de la expresión de *pSIGA20ox1* e IAA, observada entre *pSIGA20ox1::GUS* y *DR5::GUS*, junto a la encontrada con las técnicas de in situ e inmunolocalización, sugiere que ambas hormonas están estrechamente relacionadas en el desarrollo del embrión.
11. Los BR y el *S//AA9* parecen jugar un papel de interconectar las rutas de GAs y auxinas durante la fructificación. Los BR serían activadores o inductores de la síntesis de GAs y de IAA, mientras que el gen *S//AA9* actuaría como represor de la acción de GAs y auxinas.

Bibliografía

- Acciarri, N. et al., 2002. Genetically modified parthenocarpic eggplants: improved fruit productivity under both greenhouse and open field cultivation. *BMC Biotechnology*, 2(1), p.4.
- Achard, P. & Genschik, P., 2009. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of experimental botany*, 60(4), pp.1085-92.
- Alpert, K.B., Grandillo, S. & Tanksley, S.D., 1995. fw 2.2:a major QTL controlling fruit weight is common to both red- and green-fruited tomato species. *Theoretical and Applied Genetics*, 91(6-7), pp.994-1000.
- Alpert, K.B. & Tanksley, S.D., 1996. High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing fw2.2: a major fruit weight quantitative trait locus in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), pp.15503-15507.
- Anastasiou, E. et al., 2007. Control of plant organ size by KLUH/CYP78A5-dependent intercellular signaling. *Developmental cell*, 13(6), pp.843-56.
- Asami, T., Nakano, T. & Fujioka, S., 2005. Plant brassinosteroid hormones. *Vitamins and hormones*, 72, pp.479-504.
- Balbi, V. & Lomax, T.L., 2003. Regulation of early tomato fruit development by the diageotropica gene. *Plant physiology*, 131(1), pp.186-197.
- 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. *Journal of experimental botany*, 59(3), pp.585-93.
- Bensen, R.J. & Zeevaart, J.A.D., 1990. Comparison of Ent-kaurene synthetase 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. *Journal of Plant Growth Regulation*, 9(1-4), pp.237-242.
- Bishop, G.J. et al., 1999. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), pp.1761-1766.
- Bohner, J. & Bangerth, F., 1988. Effects of fruit set sequence and defoliation on cell number, cell size and hormone levels of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.) within a truss. *Plant Growth Regulation*, 7(3), pp.141-155.
- Bradley, D. et al., 1996. Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature*, 379(6568), pp.791-797.
- Bradley, D. et al., 1997. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5296), pp.80-83.

- Brukhin, V. et al., 2003. Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry. *Sexual Plant Reproduction*, 15(6), pp.311-320.
- Brumos, J., Alonso, J.M. & Stepanova, A.N., 2014. Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiologia Plantarum*, 151(1), pp.3-12.
- Carmi, N. et al., 2003. Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the rolB gene in the ovary. *Planta*, 217(5), pp.726-35.
- Carrera, E. et al., 2012. Characterization of the procerca 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 physiology*, 160(3), pp.1581-96.
- Carvalho, R.F. et al., 2011. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: «Micro-Tom» as an effective toolkit for plant development research. *Plant methods*, 7(1), p.18.
- Clouse, S.D. & Sasse, J.M., 1998. BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), pp.427-451.
- Cong, B., Barrero, L.S. & Tanksley, S.D., 2008. Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature genetics*, 40(6), pp.800-804.
- Coombe, B.G., 1976. DEVELOPMENT OF FLESHY FRUITS. *ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY AND PLANT MOLECULAR BIOLOGY*, 27, pp.207-228.
- Chakrabarti, M. et al., 2013. A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), pp.17125-30.
- Chamarro, J., 1995. Anatomía y fisiología de la planta. En F. Nuez, ed. *El cultivo del tomate*. Madrid, Barcelona, México: Ediciones Mundi Prensa, pp. 44-91.
- Chen, K.-Y. et al., 2007. Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5850), pp.643-645.
- 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), pp.1563-1573.
- Choe, S., 2006. Brassinosteroid biosynthesis and inactivation. *Physiologia Plantarum*, 126(4), pp.539-548.

- Daidoji, H., Takasaki, Y. & Nakane, P.K., 1992. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in plant proliferating cells: immunohistochemical and quantitative analysis using autoantibody and murine monoclonal antibodies to PCNA. *Cell biochemistry and function*, 10(2), pp.123-32.
- Davière, J.-M. & Achard, P., 2013. Gibberellin signaling in plants. *Development (Cambridge, England)*, 140(6), pp.1147-51.
- Devoghalaere, F. et al., 2012. A genomics approach to understanding the role of auxin in apple (*Malus x domestica*) fruit size control. *BMC Plant Biology*, 12(1), p.7.
- Edwin, F.G., Hall, M.A. & Geert-Jan, D.K. eds., 2008. *Chapter 5 Plant Growth Regulators I : Introduction ; Auxins , their Analogues and Inhibitors*, Springer.
- Ehlert, B. et al., 2008. The paramutated SULFUREA locus of tomato is involved in auxin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 59(13), pp.3635-3647.
- Ellul, P. et al., 2003. The ploidy level of transgenic plants in Agrobacterium-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent [corrected]. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 106(2), pp.231-238.
- Epstein, E., Cohen, J.D. & Slovin, J.P., 2002. The biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid changes during tomato fruit development. , pp.16-21.
- Falara, V. et al., 2011. The tomato terpene synthase gene family. *Plant physiology*, 157(2), pp.770-89.
- Fleet, C.M. et al., 2003. Overexpression of AtCPS and AtKS in Arabidopsis confers increased ent-kaurene production but no increase in bioactive gibberellins. *Plant physiology*, 132(2), pp.830-839.
- Fos, M. et al., 2001. Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system pat-3/pat-4 in tomato. *Physiologia plantarum*, 111(4), pp.545-550.
- 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(2), pp.471-80.
- Frary, A. et al., 2000. fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5476), pp.85-88.
- Fu, F.Q. et al., 2008. A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber. *Journal of Experimental Botany*, 59(9), pp.2299-2308.
- Fujioka, S. & Yokota, T., 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual review of plant biology*, 54, pp.137-164.

- García-Hurtado, N. et al., 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. *Journal of Experimental Botany*, 63(16), pp.5803-5813.
- Gillaspy, G., Ben-David, H. & Gruissem, W., 1993. Fruits: A Developmental Perspective. *The Plant cell*, 5(10), pp.1439-1451.
- Giovannoni, J.J., 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant cell*, 16 Suppl, pp.S170-S180.
- Goetz, M. et al., 2006. AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. *The Plant cell*, 18(8), pp.1873-1886.
- Goetz, M. et al., 2007. Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato. *Plant physiology*, 145(2), pp.351-366.
- Grove, M.D. et al., 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen. *Nature*, 281(5728), pp.216-217.
- Gustafson, F., 1939. Auxin distribution in fruits and its significance in fruit development. *Am. J. Botany*, 26, pp.189-194.
- Hackbusch, J. et al., 2005. A central role of Arabidopsis thaliana ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(13), pp.4908-4912.
- Hartweck, L.M., 2008. Gibberellin signaling. *Planta*, 229(1), pp.1-13.
- Hedden, P. & Thomas, S.G., 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal*, 444(1), pp.11-25.
- Hirano, K., Ueguchi-Tanaka, M. & Matsuoka, M., 2008. GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends in plant science*, 13(4), pp.192-9.
- Ho, L.C. & Hewitt, J.D., 1986. Fruit development. En J. Atherton & J. Rudich, eds. *The Tomato Crop*. The Tomato Crop. Springer Netherlands, pp. 201-239.
- Hobson, G. & Davies, J., 1970. The tomato. En *The Biochemistry of Fruits and Their Products*. London: Academic Press, pp. 437-482.
- Huttly, A.K. & Phillips, A.L., 1995. Gibberellin-regulated plant genes. *Physiol. Plant.*, 95(2), pp.310-317.
- Imai, R. et al., 1996. CLONING AND LIGHT-REGULATED EXPRESSION OF TWO cDNAs FOR ent-KAURENE SYNTHASE A FROM TOMATO. *Plant and cell physiology*, 37, p.143.

- Itoh, H. et al., 2002. The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *The Plant cell*, 14(1), pp.57-70.
- Itoh, H., Matsuoka, M. & Steber, C.M., 2003. A role for the ubiquitin-26S-proteasome pathway in gibberellin signaling. *Trends in plant science*, 8(10), pp.492-7.
- Jasinski, S. et al., 2008. PROCERA encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 56(4), pp.603-12.
- Jiang, K. et al., 2013. Tomato yield heterosis is triggered by a dosage sensitivity of the florigen pathway that fine-tunes shoot architecture. *PLoS genetics*, 9(12), p.e1004043.
- De Jong, M., Mariani, C. & Vriezen, W.H., 2009. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of experimental botany*, 60(5), pp.1523-32.
- Van Der Knaap, E. & Tanksley, S.D., 2003. The making of a bell pepper-shaped tomato fruit: identification of loci controlling fruit morphology in Yellow Stuffer tomato. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 107(1), pp.139-147.
- Kobayashi, M. et al., 2000. Gibberellin biosynthesis: Metabolic evidence for three steps in the early 13-hydroxylation pathway of rice. *Phytochemistry*, 55(4), pp.317-321.
- Koka, C. V et al., 2000. A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant physiology*, 122(1), pp.85-98.
- Koornneef, M. et al., 1990. The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 80(6), pp.852-857.
- Koshioka, M. et al., 1994. ANALYSIS OF GIBBERELLINS IN GROWING FRUITS OF LYCOPERSICON ESCULENTUM AFTER POLLINATION OR TREATMENT WITH 4-CHLOROPHENOXYACETIC ACID. *Journal of horticultural science*, 69(1), pp.171-179.
- Lemaire-Chamley, M. et al., 2005. Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant physiology*, 139(2), pp.750-769.
- Li, J. et al., 1996. A Role for Brassinosteroids in Light-Dependent Development of Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 272, pp.398-401.
- Li, Q.-F. et al., 2012. An Interaction Between BZR1 and DELLAs Mediates Direct Signaling Crosstalk Between Brassinosteroids and Gibberellins in Arabidopsis. *Science Signaling*, 5(244), pp.ra72-ra72.
- Lippman, Z. & Tanksley, S.D., 2001. Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon*

- pimpinellifolium and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics*, 158(1), pp.413-422.
- Locascio, A., Blázquez, M. a. & Alabadí, D., 2013. Genomic analysis of DELLA protein activity. *Plant and Cell Physiology*, 54(8), pp.1229-1237.
- Lombardi-Crestana, S. et al., 2012. The tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) natural genetic variation Rg1 and the DELLA mutant procerca control the competence necessary to form adventitious roots and shoots. *Journal of experimental botany*, 63(15), pp.5689-703.
- Magome, H. et al., 2013. CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(5), pp.1947-52.
- Mapelli, S. et al., 1978. Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiol.*, 19(7), pp.1281-1288.
- Martí, C. et al., 2007. Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 52(5), pp.865-76.
- Martí, E. et al., 2006. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of experimental botany*, 57(9), pp.2037-47.
- Martí, E. et al., 2010. Hormonal regulation of tomato gibberellin 20-oxidase1 expressed in Arabidopsis. *Journal of plant physiology*, 167(14), pp.1188-96.
- Martinez-Bello, L., Moritz, T. & Lopez-Diaz, I., 2015. Silencing C19-GA 2-oxidases induces parthenocarpic development and inhibits lateral branching in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*.
- McGinnis, K.M. et al., 2003. The Arabidopsis. *Society*, 15(May), pp.1120-1130.
- Molesini, B. et al., 2009. AUCSIA gene silencing causes parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant physiology*, 149(1), pp.534-548.
- Montoya, T. et al., 2005. Patterns of Dwarf expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 42(2), pp.262-9.
- Mounet, F. et al., 2012. Down-regulation of a single auxin efflux transport protein in tomato induces precocious fruit development. *Journal of experimental botany*, 63(13), pp.4901-17.
- Muñoz, S. et al., 2011. Increase in Tomato Locule Number Is Controlled by Two Single-Nucleotide Polymorphisms Located Near WUSCHEL. *Plant physiology*, 156(4), pp.2244-2254.

- Nitsch, J., 1970. Hormonal factors in growth and development. En A. Hulme, ed. *The biochemistry of fruits and their products*. London: Academic Press, pp. 427-472.
- Nuez, F., 1995. *El cultivo de tomate*, MUNDI-PRENSA LIBROS.
- Oh, K. et al., 2006. The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. *Planta*, 224(1), pp.133-44.
- Olimpieri, I. et al., 2011. Constitutive co-suppression of the GA 20-oxidase1 gene in tomato leads to severe defects in vegetative and reproductive development. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*, 180(3), pp.496-503.
- Olimpieri, I. et al., 2007. Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta*, 226(4), pp.877-88.
- Olszewski, N., Sun, T.-P. & Gubler, F., 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant cell*, 14 Suppl(Figure 1), pp.S61-S80.
- Ouyang, J., Shao, X. & Li, J., 2000. Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 24(3), pp.327-333.
- Ozga, J. a. & Reinecke, D.M., 2003. Hormonal Interactions in Fruit Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22, pp.73-81.
- Pandolfini, T. et al., 2002. Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC biotechnology*, 2, p.1.
- Pandolfini, T., Molesini, B. & Spena, A., 2007. Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends in plant science*, 12(8), pp.327-9.
- Paran, I. & Van Der Knaap, E., 2007. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), pp.3841-3852.
- Pattison, R.J. & Catalá, C., 2012. Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the PIN and AUX/LAX gene families. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 70(4), pp.585-98.
- Picken, A., 1984. A review of pollination and fruitset in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Journal of horticultural science*, 59, pp.1-13.
- Pnueli, L. et al., 1998. The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development (Cambridge, England)*, 125(11), pp.1979-1989.

- Rameau, C. et al., 2015. Multiple pathways regulate shoot branching. , 5(January), pp.1-15.
- Rebers, M. et al., 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 17(3), pp.241-50.
- Ren, Z. et al., 2011. The auxin receptor homologue in *Solanum lycopersicum* stimulates tomato fruit set and leaf morphogenesis. *Journal of experimental botany*, 62(8), pp.2815-26.
- Rodríguez, G.R. et al., 2011. Distribution of SUN, OVATE, LC, and FAS in the tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. *Plant physiology*, 156(1), pp.275-285.
- Rotino, G.L. et al., 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnology*, 15(13), pp.1398-1401.
- Scott, J. & Harbaugh, B., 1989. *Micro-tom: A Miniature Dwarf Tomato*, Agricultural Experiment Station, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Serrani, J.C. et al., 2008. Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 56(6), pp.922-34.
- Serrani, J.C., Fos, M., et al., 2007. Effect of Gibberellin and Auxin on Parthenocarpic Fruit Growth Induction in the cv Micro-Tom of Tomato. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), pp.211-221.
- Serrani, J.C., Sanjuán, R., et al., 2007. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant physiology*, 145(1), pp.246-57.
- Serrani, J.C. et al., 2010. Inhibition of auxin transport from the ovary or from the apical shoot induces parthenocarpic fruit-set in tomato mediated by gibberellins. *Plant physiology*, 153(2), pp.851-62.
- Smulders, M.J.M., Rus-Kortekaas, W. & Gilissen, L.J.W., 1994. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science*, 97(1), pp.53-60.
- Sun, T., 2010. Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant physiology*, 154(2), pp.567-570.
- Sun, T.-P., 2011. The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Current biology : CB*, 21(9), pp.R338-45.
- Sun, T.-P. & Gubler, F., 2004. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 55, pp.197-223.

- Suzuka, I. et al., 1989. Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase δ auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(9), pp.3189-3193.
- Szekeres, M. et al., 1996. Brassinosteroids Rescue the Deficiency of CYP90, a Cytochrome P450, Controlling Cell Elongation and De-etiolation in Arabidopsis. *Cell*, 85(2), pp.171-182.
- Tanksley, S.D., 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant cell*, 16 Suppl, pp.S181-S189.
- Thomas, S.G., Rieu, I. & Steber, C.M., 2005. Gibberellin metabolism and signaling. *Vitamins and hormones*, 72, pp.289-338.
- Ueguchi-Tanaka, M. et al., 2005. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437(7059), pp.693-8.
- Ulmasov, T. et al., 1997. Creation of a Highly Active Synthetic AuxRE. *The Plant cell*, 9(November), pp.1963-1971.
- Vardhini, B.V. & Rao, S.S.R., 2002. Acceleration of ripening of tomato pericarp discs by brassinosteroids. *Phytochemistry*, 61(7), pp.843-847.
- Varga, A. & Bruinsma, J., 1976. Roles of Seeds and Auxins in Tomato Fruit Growth. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 80(2), pp.95-104.
- Varga, A. & Bruinsma, J., 1986. Tomato. En C. Press, ed. *CRC handbook of fruit set and development*. CRC series in nutrition and food. pp. 461-480.
- Vivian-Smith, A. et al., 2001. Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in Arabidopsis. *Development*, 128(12), pp.2321-2331.
- Vriezen, W.H. et al., 2008. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *The New phytologist*, 177(1), pp.60-76.
- Wang, H. et al., 2009. Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. *The Plant cell*, 21(5), pp.1428-52.
- Wang, H. et al., 2005. The Tomato Aux / IAA Transcription Factor IAA9 Is Involved in Fruit Development and Leaf Morphogenesis. *The Plant cell*, 17(October), pp.2676-2692.
- Wang, S. et al., 2007. Arabidopsis Ovate Family Protein 1 is a transcriptional repressor that suppresses cell elongation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 50(5), pp.858-872.

- Wang, S. et al., 2011. Arabidopsis Ovate family proteins, a novel transcriptional repressor family, control multiple aspects of plant growth and development. *PLoS ONE*, 6(8).
- Woodward, A.W. & Bartel, B., 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95(5), pp.707-735.
- Wu, S. et al., 2011. SUN Regulates Vegetative and Reproductive Organ Shape by Changing Cell Division Patterns. *Plant Physiology*, 157(3), pp.1175-1186.
- Yamaguchi, S., 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual review of plant biology*, 59, pp.225-51.
- Zazimalova, E. & Napier, R.M., 2003. Points of regulation for auxin action. *Plant cell reports*, 21(7), pp.625-34.
- Zhang, J. et al., 2007. A single-base deletion mutation in SlIAA9 gene causes tomato (*Solanum lycopersicum*) entire mutant. *Journal of Plant Research*, 120(6), pp.671-678.
- Zhang, M. et al., 2011. Spatiotemporal manipulation of auxin biosynthesis in cotton ovule epidermal cells enhances fiber yield and quality. *Nature biotechnology*, 29(5), pp.453-458.