



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



TESIS DOCTORAL

Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), identificación de mutantes de inserción afectados en caracteres del desarrollo y caracterización de mutantes de fruto partenocárpico

GÉRALDINE GOERGEN
Valencia, 2016

Directores:
Dr. Vicente Moreno Ferrero
Dr. Benito Pineda Chaza

D. VICENTE MORENO FERRERO, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Genética del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia y

D. BENITO JOSÉ PINEDA CHAZA, Doctor Ingeniero Agrónomo e Investigador JAE-doc del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC)

CERTIFICAN que:

Dña. Géraldine Goergen, Ingeniero Agrónomo, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que, con el título “Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*), identificación de mutantes de inserción afectados en caracteres del desarrollo y caracterización de mutantes de fruto partenocárpico”, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos académicos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 29 de enero de 2016.

DR. D. VICENTE MORENO FERRERO

DR. D. BENITO JOSÉ PINEDA CHAZA

GRACIAS

A España, que no es mi país de origen, y a la sorprendente ciudad Valencia. Ambos me han acogido durante casi 9 años, y aún no consigo medir la importancia que ha tenido para mí esta experiencia.

Al CSIC, a la Universidad Politécnica de Valencia y al IBMCP. Tuve la suerte de disfrutar de una beca pre-doctoral JAE, de una formación de calidad en locales con equipo de punta* cuando aún no se hablaba de crisis, y la suerte de presentar una tesis cuando aún se vivía con sus secuelas, dándome la oportunidad de acabar lo que había empezado.

A mi primer contacto del laboratorio de Cultivos Celulares y co-director de tesis, Vicente Moreno, que ha confiado en mí para incorporarme en su laboratorio. Dicen que es un gusto poder ofrecerle trabajo a alguien. Desde mi punto de vista, ha sido un placer aceptarlo.

A Benito Pineda, mi otro co-director de tesis, increíble fuerza de trabajo y hombre leal. Y a mis dos directores : una piensa en agradecer la dedicación, pero creo que se olvida demasiadas veces agradecer el escepticismo (en su justa medida). Porque demuestra que uno realmente presta atención, poniendo a prueba la robustez del argumento para volverlo inatacable. Lo entendí un poco tarde.

A M^a Carmen Bolarín y su laboratorio, en el cual he tenido la suerte de realizar una estancia para iniciarme a las técnicas de microscopía: A Enrique Olmos y a Nieves Fernández, así como a los compañeros del CEBAS.

Al laboratorio de Rafael Lozano. Su colaboración y la del grupo de M^a Carmen Bolarín, el “tripartito”, hace que nuestros resultados cobren más sentido.

A Begoña García y Alejandro Atarés. Cada uno a su manera ha conseguido hacerme ver las cosas con un ángulo inesperado. Gracias por tu apoyo sin fallo, Begoña, y por el decreto del patrón de Cultivos Celulares... San Callo.

* obviando los autoclaves de la fundación Dharma en Agrónomos

GRACIAS

A mis otros compañeros de laboratorio que han compartido conmigo la vida de la cabina de flujo y del invernadero, y se han vuelto amigos: Peter Schleicher, Teresa Antón, Sibilla Sánchez, Jorge Sánchez y Pilar Angarita. Compartir es vivir.

A Marisol Gascón, M^a Dolores Gómez, y a todos lo que he conocido en el servicio de microscopía, y que me han dejado entrever la magia del corte perfecto.

A mis padres, Paul et Isabelle Goergen, por su incondicional apoyo y la libertad de elección que siempre me han ofrecido.

A mi hermano Nicolas Goergen, porque me ha robado sin vergüenza el título de este apartado de mi primer libro para su primera obra de teatro.

A Verena Behrens-Baumann, mi gran amiga, mi hermana (¿mi madre?).

A los que poco cruzamos en esferas privadas pero que son pilares de nuestra vida profesional; a los próximos de nuestra vida personal que nos procuran los ánimos para desarrollarnos sanamente en la vida profesional, a los que admiro, a los que me han animado a seguir con esta tesis, a los en general que han conducido a que exista... Obviamente, es difícil nombrarles a todos, pero me gustaría que figurasen allí: María Vargas, Jesús Romero, Luis Solano, Vicente Navarro, Jaime Cebolla, Laura España, Ana Cristina Izquierdo, Elisa Favre, Sabina Asencio, Elena Moyano, Fanny Faroux, Muriel Bienvenu, Georges-Alain Thierry, Annick Jay, Vicente Conejero.

Comparto esta sensación de que el fin de la tesis marca el final de una etapa en la vida. Me siento afortunada de haber vivido estos años disfrutando realmente mi vida profesional y personal, gracias a vosotros. Siempre recordaré con cariño estos años de doctorado[†], tan distintos y enriquecedores tiempos dorados.

[†] así como la fobia a cualquier tipo de contaminación y el miedo al apagón del la cámara de cultivos en agosto

*La educación
es el descubrimiento de nuestra propia
ignorancia.*

(Will Durant)

ÍNDICE

ÍNDICES.....	I
Índice General.....	I
Índice de Figuras.....	V
Índice de Tablas.....	XI
RESÚMENES.....	XIII
Resumen (Castellano)	XIII
Resum (Valencià)	XV
Summary (English)	XVII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. El tomate y la mejora.....	3
2. El desarrollo floral en tomate.....	7
2.1. Morfología de la flor de tomate.....	7
2.2. Etapas del desarrollo floral.....	8
2.3. El modelo ABC (DE) en tomate.....	10
2.4. Desarrollo de las anteras y del polen.....	12
2.5. Desarrollo de los óvulos y del ovario.....	18
3. El desarrollo de fruto en tomate.....	21
3.1. Morfología del fruto de tomate.....	21
3.2. Etapas del desarrollo del fruto.....	22
3.3. Control hormonal del desarrollo del fruto.....	26
4. Cuajado de fruto y partenocarpia.....	28
4.1. Implicación de las auxinas en el cuajado.....	30
4.2. Implicación de las giberelinas en el cuajado.....	34
4.3. Implicación de las citoquininas en el cuajado.....	37
4.4. Implicación del etileno en el cuajado.....	38
4.5. Implicación del ácido abscísico en el cuajado.....	39
4.6. Mutantes partenocárpicos y genes homeóticos florales.....	41
4.7. Integración de los diferentes componentes implicados en el cuajado de fruto...	44
5. Mutagénesis insercional.....	47

ÍNDICE

5.1. Genómica funcional y genética del desarrollo.....	47
5.2. Los mutantes como herramienta de genómica funcional.....	48
5.3. Mutagénesis insercional con T-DNA.....	49
5.4. Naturaleza de las mutaciones en las planas transgénicas.....	52
5.5. Vectores modificados. Etiquetado mediante trampas génicas (<i>trapping</i>).....	54
OBJETIVOS.....	59
MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
1. Material vegetal.....	63
2. Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i>	63
2.1. Esterilización de semillas.....	63
2.2. Germinación y obtención de plántulas axénicas.....	63
2.3. Cultivo de explantes primarios.....	64
2.4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios.....	64
2.4.1. Inducción de organogénesis.....	64
2.4.2. Enraizamiento de los brotes y clonación de las plantas.....	65
2.5. Determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas mediante citometría de flujo.....	65
2.6. Re-introducción de brotes a condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	66
3. Transformación genética.....	67
3.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : cepa bacteriana, plásmido y genes incluidos en el T-DNA.....	67
3.2. Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	67
3.3. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas..	68
3.4. Enraizamiento de los brotes transgénicos.....	69
3.5. Aclimatación y trasplante.....	69
3.6. Polinización cruzada.....	70
4. Caracterización del desarrollo reproductivo.....	71
4.1. Caracterización de flores.....	71
4.1.1. Estadios del desarrollo floral evaluados.....	71
4.1.2. Análisis de la viabilidad de los granos de polen.....	71
4.1.3. Preparación de muestras para microscopía óptica.....	73

4.2. Caracterización de frutos.....	74
4.2.1. Estadios del desarrollo del fruto evaluados.....	74
4.2.2. Evaluación de las características del fruto.....	75
5. Análisis de co-segregación: resistencia a la kanamicina en brotes reintroducidos a condiciones <i>in vitro</i>	76
6. Análisis de expresión del gen delator <i>Uida</i>	77
RESULTADOS.....	79
1. Caracterización fenotípica del cultivar de tomate “Moneymaker”.....	81
1.1. Caracterización fenotípica del desarrollo vegetativo.....	81
1.2. Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo.....	83
1.3. Respuesta al ensayo histoquímico GUS.....	86
2. Generación de una colección de líneas T-DNA de tomate (cv. Moneymaker) e identificación de mutantes dominantes con alteraciones en caracteres del desarrollo.....	90
2.1. Generación de una colección de líneas T-DNA de tomate.....	90
2.2. Detección de mutantes con efectos dominantes.....	93
2.2.1. Descripción de algunos mutantes con alteraciones en el desarrollo vegetativo.....	94
2.2.2. Descripción de algunos mutantes alterados en el desarrollo de la inflorescencia, la flor o las zonas de abscisión.....	102
2.2.3. Descripción de algunos mutantes alterados en el desarrollo de fruto.....	112
3. Caracterización de mutantes de fruto partenocárpico.....	120
3.1. <i>Tom1648</i> (<i>PAB = Premature Abscission in Breaker</i>)	123
3.1.1. Descripción de fenotipo mutante.....	123
3.1.2. Análisis de las alteraciones en el desarrollo reproductivo.....	128
3.1.3. Análisis de la expresión del gen delator <i>Uida</i>	134
3.1.4. Corolario.....	139
3.2. <i>Tom157</i>	140
3.2.1. Descripción de fenotipo mutante.....	140
3.2.2. Análisis de las alteraciones en el desarrollo reproductivo.....	143
3.2.3. Análisis de la expresión del gen delator <i>Uida</i>	150
3.2.4. Corolario.....	150
3.3. <i>Tom316</i>	152

ÍNDICE

3.3.1. Descripción de fenotipo mutante.....	152
3.3.2. Análisis de las alteraciones en el desarrollo reproductivo.....	154
3.3.3. Análisis de la expresión del gen delator <i>UidA</i>	160
3.3.4. Análisis genético de la descendencia procedente del cruce entre el mutante y el WT.....	162
3.3.5. Corolario.....	164
3.4. <i>Tom497</i>	165
3.4.1. Descripción de fenotipo mutante.....	165
3.4.2. Análisis de las alteraciones en el desarrollo reproductivo.....	169
3.4.3. Análisis de la expresión del gen delator <i>UidA</i>	172
3.4.4. Análisis genético de la descendencia procedente del cruce entre el mutante y el WT.....	176
3.4.5. Corolario.....	180
3.5. <i>Tom24</i>	181
3.5.1. Descripción de fenotipo mutante.....	181
3.5.2. Análisis de las alteraciones en el desarrollo reproductivo.....	185
3.5.3. Análisis de la expresión del gen delator <i>UidA</i>	192
3.5.4. Análisis genético de la descendencia procedente del cruce entre el mutante y el WT.....	195
3.5.5. Corolario.....	199
DISCUSIÓN.....	201
1. Utilidad de los mutantes para la disección genética de caracteres complejos.....	201
2. Generación de una colección de líneas T-DNA en tomate.....	205
3. Mutantes partenocárpicos y alteraciones en el desarrollo vegetativo.....	208
4. Mutantes partenocárpicos y alteraciones en el desarrollo reproductivo.....	212
5. Mutantes partenocárpicos y alteraciones en la tasa de cuajado de fruto.....	215
6. Mutantes partenocárpicos y androesterilidad.....	218
7. Mutantes partenocárpicos y desarrollo de los óvulos.....	221
8. Inferencias en torno a la base de la expresión del gen delator y la inserción del T-DNA	223
CONCLUSIONES.....	229
BIBLIOGRAFÍA.....	233

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1	Portada de la revista <i>Nature</i> (Vol. 485, 31 de Mayo de 2012).....	4
Figura 2	Estructuras florales de tomate (cv. Moneymaker).....	7
Figura 3	Distintos estadios de desarrollo de la flor de tomate.....	9
Figura 4	Modelo ABC (DE): control genético del desarrollo de los órganos florales.....	10
Figura 5	Genes implicados en el desarrollo del gametofito masculino de <i>Arabidopsis</i>	15
Figura 6	Anatomía del fruto de tomate (cv. Moneymaker).....	22
Figura 7	Ovario y fruto de tomate (secciones transversales).....	23
Figura 8	Desarrollo del fruto de tomate y su regulación hormonal.....	24
Figura 9	Frutos de tomate en estadio verde inmaduro, verde maduro, pintón, rosa y rojo maduro, respectivamente, en vista lateral y en sección transversal....	25
Figura 10	Mecanismo molecular de represión/activación de genes de respuesta a las auxinas.....	31
Figura 11	Metabolismo de las giberelinas (GAs) y su compartimentación subcelular.....	35
Figura 12	Modelo sobre la regulación del desarrollo del fruto partenocárpico a través de las rutas de señalización hormonales.....	45
Figura 13	Construcciones utilizadas en los diversos tipos de trampas génicas.....	56

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 14	Esquema del vector pD991.....	67
Figura 15	Caracteres evaluados en el fruto de Moneymaker (índices analíticos).....	75
Figura 16	Brotos cultivados <i>in vitro</i> en medio de clonación sin o con 100mg/L de kanamicina, 15 días de cultivo.....	76

RESULTADOS

Figura 17	Planta de tomate del cv. Moneymaker, esquema representativo de su patrón de crecimiento y diferentes partes de una hoja de tomate.....	82
Figura 18	Flor en anthesis e inflorescencia de una planta de tomate del cv. Moneymaker.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 19	Pistilo, ovario y corte transversal del ovario de una flor en antesis de tomate (cv. Moneymaker).....	84
Figura 20	Frutos de tomate (cv. Moneymaker) en diversos estadios de desarrollo: verde maduro, pintón, rosa y rojo maduro.	84
Figura 21	Actividad GUS en frutos de Moneymaker en estadio de verde inmaduro de 0,8cm, 1,8cm, 2,7cm y 3,5cm.....	88
Figura 22	Actividad GUS en frutos de Moneymaker en estadio de verde maduro, pintón, rosa y rojo maduro.....	88
Figura 23	Actividad GUS en la zona de abscisión del pedicelo de fruto de Moneymaker en los estadios verde inmaduro de 0,8cm, de 1,8cm, de 2,7cm y de 3,5cm, así como en los estadios verde maduro, pintón, rosa y rojo maduro.....	89
Figura 24	Cultivo de las plantas transgénicas en la cámara de nuestro laboratorio (mantenimiento de la colección) y en el invernadero (evaluación fenotípica y caracterización).....	92
Figura 25	Tipos de alteraciones del desarrollo en los 28 mutantes identificados en la colección de líneas T-DNA (plantas TG1) con la trampa de intensificadores..	94
Figura 26	Fenotipo <i>in vivo</i> del mutante <i>Tom1252</i>	95
Figura 27	Fenotipo <i>in vivo</i> del mutante <i>Tom57</i>	96
Figura 28	Fenotipo <i>in vivo</i> del mutante <i>Tom209</i>	98
Figura 29	Patrón de expresión GUS en el mutante <i>Tom209</i>	99
Figura 30	Fenotipo <i>in vivo</i> del mutante <i>Tom54</i>	101
Figura 31	Fenotipo <i>in vivo</i> del mutante <i>Tom1819</i>	103
Figura 32	Fenotipo <i>in vivo</i> del mutante <i>Tom1491</i>	105
Figura 33	Patrón de expresión GUS en el mutante <i>Tom1491</i>	106
Figura 34	Fenotipo <i>in vivo</i> del mutante <i>Tom1336</i>	107
Figura 35	Flores del mutante <i>Tom1336</i> en diversos estadios de desarrollo.....	108
Figura 36	Fruto verde abierto de <i>Tom1336</i> claramente iterativo que da lugar a una flor compuesta, cuyos ovarios a su vez son iterativos.....	109
Figura 37	Fruto cerrado de <i>Tom1336</i> en estadio rojo maduro.....	110
Figura 38	Patrón de expresión GUS en algunos tejidos del mutante <i>Tom1336</i>	111
Figura 39	Fenotipo de las flores y de los frutos del mutante <i>Tom1280</i>	113
Figura 40	Desarrollo vegetativo <i>in vivo</i> del mutante <i>Tom654</i>	115
Figura 41	Desarrollo reproductivo del mutante <i>Tom654</i>	116
Figura 42	Expresión GUS en las partes vegetativas del mutante <i>Tom654</i>	117
Figura 43	Expresión GUS en las flores del mutante <i>Tom654</i>	118
Figura 44	Expresión GUS en los frutos del mutante <i>Tom654</i>	119

Figura 45	Hojas y foliolos de Moneymaker y del mutante <i>Tom1648</i>	123
Figura 46	Flores de Moneymaker y de <i>Tom1648</i> y pistilos de estas flores.....	124
Figura 47	Frutos de Moneymaker y de <i>Tom1648</i>	126
Figura 48	Cuajado en el mutante <i>Tom1648</i>	127
Figura 49	Tinción vital con acetato de carmín del polen de Moneymaker y del polen de <i>Tom1648</i>	129
Figura 50	Polen de flores de Moneymaker y de <i>Tom1648</i> en los estadios de botón floral 1, botón floral 2, preantesis y antesis.....	130
Figura 51	Ovarios y óvulos de Moneymaker y de <i>Tom1648</i>	132
Figura 52	Expresión del delator (<i>Uida</i>) en tejidos u órganos vegetativos del mutante <i>Tom1648</i>	134
Figura 53	Expresión del delator (<i>Uida</i>) en flores de <i>Tom1648</i>	136
Figura 54	Expresión del delator (<i>Uida</i>) en el frutos de <i>Tom1648</i>	138
Figura 55	Plantas de Moneymaker y de <i>Tom157</i>	141
Figura 56	Frutos de Moneymaker y del mutante <i>Tom157</i>	142
Figura 57	Ovario en estadio de antesis de Moneymaker y del mutante <i>Tom157</i>	143
Figura 58	Sección transversal de un ovario en antesis y detalle de los óvulos de Moneymaker y de <i>Tom157</i>	144
Figura 59	Tinción vital con acetato de carmín de los pólenes de Moneymaker y de <i>Tom157</i>	145
Figura 60	Secciones transversales de anteras en flores de Moneymaker y de <i>Tom157</i>	147
Figura 61	Granos de polen de flores de Moneymaker y de <i>Tom157</i> en los estadios de botón floral 1, botón floral 2, preantesis y antesis.....	149
Figura 62	Análisis de la expresión del gen delator (<i>Uida</i>) en frutos de Moneymaker y de <i>Tom157</i> en estadio rojo maduro.....	150
Figura 63	Hojas adultas de Moneymaker y de <i>Tom316</i>	152
Figura 64	Flores de Moneymaker y de <i>Tom316</i> en estadio de preantesis y antesis.....	153
Figura 65	Ovario de flores en estadio de antesis de Moneymaker y de <i>Tom316</i>	153
Figura 66	Frutos de Moneymaker y de <i>Tom316</i>	154
Figura 67	Secciones transversales de ovarios en antesis y detalle de los óvulos de Moneymaker y de <i>Tom316</i>	155
Figura 68	Tinción vital con acetato de carmín de granos de polen de Moneymaker y de <i>Tom316</i>	155
Figura 69	Secciones transversales de flores de Moneymaker y de <i>Tom316</i>	157
Figura 70	Granos de polen de flores de Moneymaker y de <i>Tom316</i> en los estadios de botón floral 1, botón floral 2, preantesis y antesis.....	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 71	Expresión del gen delator (<i>Uida</i>) en <i>Tom316</i>	161
Figura 72	Hojas de Moneymaker y de <i>Tom497</i>	165
Figura 73	Flores de Moneymaker y de <i>Tom497</i>	166
Figura 74	Detalle de la zona de dehiscencia en una antera de una flor en antesis de Moneymaker y de <i>Tom497</i>	166
Figura 75	Frutos de Moneymaker y de <i>Tom497</i>	167
Figura 76	Una inflorescencia de <i>Tom497</i> en la cual todas las flores han dado lugar a frutos.....	168
Figura 77	Tinción vital con acetato de carmín de los granos de polen de Moneymaker y de <i>Tom497</i>	169
Figura 78	Histología de anteras de Moneymaker y de <i>Tom497</i> en los estadios de botón floral 1, botón floral 2, preantesis y antesis.	171
Figura 79	Secciones transversales de ovarios en antesis y detalle de los óvulos de Moneymaker (arriba) y de <i>Tom497</i> (abajo)	172
Figura 80	Expresión del gen delator (<i>Uida</i>) en diferentes órganos o tejidos vegetativos de <i>Tom497</i>	173
Figura 81	Expresión del gen delator (<i>Uida</i>) en flores de <i>Tom497</i>	174
Figura 82	Expresión del gen delator (<i>Uida</i>) en frutos de <i>Tom497</i>	175
Figura 83	Cruce entre un mutante dominante con 2 copias de T-DNA y una planta WT. Segregación genotípica, fenotípica (asumiendo que una de las copias de T-DNA promueva una mutación dominante) y presencia o ausencia de T-DNA en la progenie resultante del cruce.....	176
Figura 84	Hojas y frutos de Moneymaker, de <i>Tom497</i> y de una planta obtenida a partir del cruce entre el mutante y Moneymaker.....	178
Figura 85	Cruce entre un mutante dominante con 2 copias de T-DNA y una planta WT. Segregación genotípica, fenotípica (asumiendo que las dos copias de T-DNA promuevan el fenotipo dominante) y presencia o ausencia de T-DNA en la progenie resultante del cruce.....	179
Figura 86	Hojas y flores de Moneymaker y de <i>Tom24</i>	181
Figura 87	Frutos y detalle del interior del fruto de Moneymaker y de <i>Tom24</i>	182
Figura 88	Inflorescencia de Moneymaker mostrando 5 frutos cuajados e inflorescencia de <i>Tom24</i> mostrando 10 frutos cuajados.....	183
Figura 89	Detalle de la zona de dehiscencia en una antera de una flor en antesis de Moneymaker y de <i>Tom24</i>	185
Figura 90	Tinción vital con acetato de carmín del polen de Moneymaker y de <i>Tom24</i>	186
Figura 91	Histología de las anteras de Moneymaker y de <i>Tom24</i> en los estadios de botón floral 1, botón floral 2, preantesis y antesis.....	187
Figura 92	Granos de polen de flores de Moneymaker y de <i>Tom24</i> en los estadios de botón floral 1, botón floral 2, preantesis y antesis.....	189

Figura 93	Secciones transversales de ovarios en antesis y detalle de los óvulos de Moneymaker y de <i>Tom24</i>	191
Figura 94	Expresión del gen delator (<i>Uida</i>) en ápices de <i>Tom24</i>	192
Figura 95	Expresión del gen delator (<i>Uida</i>) en flores de <i>Tom24</i> en estadios de botón floral 1, botón floral 2, antesis y 2 días postantesis.....	193
Figura 96	Expresión del gen delator (<i>Uida</i>) en frutos de <i>Tom24</i>	194
Figura 97	Cruce entre un mutante dominante con 3 copias de T-DNA y una planta WT. Segregación genotípica, fenotípica (asumiendo que una de las copias de T-DNA promueva una mutación dominante) y presencia o ausencia de T-DNA en la progenie resultante del cruce.....	195
Figura 98	Cruce entre un mutante dominante con 3 copias de T-DNA y una planta WT. Segregación genotípica, fenotípica (asumiendo que la mutación es de origen somaclonal) y presencia o ausencia de T-DNA en la progenie resultante del cruce.....	197
Figura 99	Cruce entre un mutante dominante con 3 copias de T-DNA y una planta WT. Segregación genotípica, fenotípica (asumiendo que una de las copias de T-DNA promueva una mutación dominante) y presencia o ausencia de T-DNA en la progenie resultante del cruce.....	198
 DISCUSIÓN		
Figura 100	Hojas adultas de Moneymaker y de los mutantes partenocárpicos <i>Tom209</i> , <i>Tom157</i> , <i>Tom1648</i> , <i>Tom497</i> , <i>Tom654</i> y <i>Tom1491</i>	208
Figura 101	Detalle de un corte transversal de fruto en Moneymaker y en los mutantes partenocárpicos <i>Tom24</i> , <i>Tom157</i> , <i>Tom209</i> , <i>Tom316</i> , <i>Tom497</i> , <i>Tom654</i> y <i>Tom1648</i>	221

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1	Mutantes y genes de tomate implicados en el desarrollo de la flor.....	11
---------	--	----

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 2	Morfología de la flor de tomate cv. 'MoneyMaker' y estado de desarrollo de los órganos reproductivos.....	72
Tabla 3	Composición de la solución tamponada X-Gluc.....	77
Tabla 4	Órganos o tejidos y estadios de desarrollo analizados en el ensayo histoquímico GUS.....	78

RESULTADOS

Tabla 5	Número de flores y frutos en las 7 primeras inflorescencias de plantas de tomate del cv. MoneyMaker.....	83
Tabla 6	Características del ovario de MoneyMaker en el estadio de antesis en dos cosechas diferentes.....	84
Tabla 7	Caracteres relacionados con el fruto de MoneyMaker en dos cosechas diferentes.....	85
Tabla 8	Número de plantas transgénicas de tomate (cv. MoneyMaker) obtenidas con el vector pD991.	92
Tabla 9	Diámetro del ovario y longitud del estilo en flores en antesis de MoneyMaker y del mutante <i>Tom1648</i>	123
Tabla 10	Características de los frutos de MoneyMaker y de <i>Tom1648</i>	126
Tabla 11	Características de los frutos de MoneyMaker y de <i>Tom157</i>	142
Tabla 12	Características del ovario de MoneyMaker y de <i>Tom157</i> en estadio de antesis.	143
Tabla 13	Anteras aparentemente normales y anómalas en 12 flores de MoneyMaker y 11 flores de <i>Tom157</i>	146
Tabla 14	Características del ovario de MoneyMaker y de <i>Tom316</i> en el estadio de antesis.	153
Tabla 15	Análisis de la χ^2 para segregaciones de la resistencia a kanamicina de 3:1 (2 insertos), 7:1 (3 insertos), 15:1 (4 insertos) o 31:1 (5 insertos) en la población de las 18 plantas de retrocruce de <i>Tom316</i>	163
Tabla 16	Características de los ovarios de MoneyMaker y del mutante <i>Tom497</i> en flores en antesis de plantas de 2-3 meses y 4-5 meses.....	166

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 17	Características de los frutos de Moneymaker y del mutante <i>Tom497</i>	168
Tabla 18	Características de los frutos de Moneymaker y de <i>Tom24</i>	183
Tabla 19	Número de flores y de frutos por inflorescencia y tasa de cuajado de Moneymaker y del mutante <i>Tom24</i>	184
Tabla 20	Características del ovario de Moneymaker y de <i>Tom24</i> el estadio de antesis.	190

RESUMEN

Con el fin de identificar genes que controlan caracteres del desarrollo y tolerancia a estrés abiótico, estamos abordando un programa de mutagénesis insercional en colaboración con los grupos del Dr. Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia). Esta Tesis Doctoral se enmarca en el contexto de este programa de mutagénesis insercional y tiene como objetivo central seguir profundizando en la disección genética de caracteres relevantes desde un punto de vista agronómico a través de la generación y caracterización de líneas T-DNA de tomate.

Con el objetivo de ampliar la colección que previamente se ha generado en nuestro grupo, se han obtenido 974 líneas T-DNA de tomate y se ha llevado a cabo la evaluación de estas líneas a fin de detectar mutantes dominantes o semidominantes afectados en caracteres vegetativos y/o reproductivos. En particular, la identificación de mutantes con cambios en el cuajado y desarrollo del fruto tiene una enorme relevancia a nivel agronómico dado que los genes alterados en estos mutantes intervienen sobre caracteres que contribuyen a la producción de un cultivar.

El proceso de cuajado, es decir, la transición desde el ovario a un fruto en desarrollo, ocurre una vez la flor alcanza el estadio de antesis, y depende del éxito de la polinización y de la fecundación. No obstante, el desarrollo del fruto puede ser independiente de la polinización a través de un proceso denominado partenocarpia. En ambos procesos de cuajado, dependiente e independiente de polinización, están implicadas señales hormonales, especialmente auxinas y giberelinas (GAs). Aún así, la base genética de los mecanismos que desencadenan la transición del ovario a fruto es en gran medida desconocida. En este sentido, la disponibilidad de mutantes de tomate puede ser una herramienta muy valiosa para avanzar en el conocimiento de las bases moleculares y genéticas que promueven el cuajado del fruto dependiente e independiente de polinización.

Habida cuenta del interés que suscita la partenocarpia, el trabajo realizado en el contexto de esta Tesis Doctoral se ha centrado en una serie de mutantes que desarrollan frutos sin semillas. La caracterización de estos mutantes ha permitido observar alteraciones en el desarrollo vegetativo (e.g. arquitectura foliar) y/o

RESUMEN

reproductivo (e.g. morfología del fruto) que sugieren cambios en los niveles endógenos de hormonas (e.g. auxinas y giberelinas) estrechamente vinculadas al desarrollo partenocárpico del fruto. El análisis histológico ha indicado que la mayor parte de los mutantes exhiben androesterilidad citológica, y algunos también muestran alteraciones en la formación de los sacos polínicos o el desarrollo de la antera, un carácter que también está vinculado al desarrollo partenocárpico del fruto. Por otro lado, se ha comprobado que la mayor tasa de cuajado de algunos mutantes partenocárpicos promueve una mayor producción por planta. En algunos mutantes se ha observado una estrecha relación entre la expresión del delator y la mutación, es decir, la actividad GUS se detecta en los órganos afectados, lo que sugiere que el gen responsable del fenotipo mutante se encuentra etiquetado por un T-DNA. Por último, la caracterización fenotípica, genética y molecular de plantas de la progenie de retrocruce del mutante *Tom24* sugiere que el fenotipo se debe a un inserto de T-DNA que no se transmite a la descendencia debido a que provoca letalidad en ambos tipos de gametos (♂ y ♀).

RESUM

Pel tal d'identificar els gens que controlen caràcters del desenvolupament i tolerància a estrès abiòtic, estem abordant un programa de mutagènesi insercional en col·laboració amb els grups del Dr. Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia). Aquesta Tesi Doctoral s'emmarca en el context d'aquest programa de mutagènesi insercional y té l'objectiu central seguir profunditzant en la dissecció genètica de caràcters rellevants des d'un punt de vista agronòmic a través de la generació y caracterització de línies T-DNA de tomaca.

Amb l'objectiu d'ampliar la col·lecció que prèviament s'ha generada en el nostre grup, s'han obtingut 974 línies T-DNA de tomaca y s'ha dut a terme l'avaluació d'aquestes línies amb la finalitat de detectar mutants dominants o semidominants afectats en caràcters vegetatius i/o reproductius. En particular, la identificació de mutants amb canvis en el quallat i desenvolupament del fruit té una enorme rellevància a nivell agronòmic atès que els gens alterats en aquests mutants intervenen sobre caràcters que contribueixen a la producció de un cultivar.

El procés del quallat, és a dir, la transició des de l'ovari a un fruit en desenvolupament, passa una vegada la flor arriba a l'estadi d'antesi, y depèn de l'èxit de la pol·linització i de la fecundació. No obstant, el desenvolupament del fruit pot ser independent de la pol·linització a través d'un procés denominat partenocàrpia. En ambos processos de quallat, dependent o independent de pol·linització, estan implicats senyals hormonals, especialment auxines i gibberel·lines (GAs). Tot i així, la base genètica dels mecanismes que desencadenen la transició de l'ovari al fruit és en gran mesura desconeguda. En aquest sentit, la disponibilitat de mutants de tomaca pot ser una eina molt valuosa per a avançar en el coneixement de les bases moleculars y genètiques que promouen el quallat del fruit dependent o independent de pol·linització.

Tenint en compte de l'interès que suscita la partenocàrpia, el treball realitzat en el context d'aquesta Tesi Doctoral s'ha centrat en una sèrie de mutants que desenvolupen fruits sense llavors. La caracterització d'aquests mutants ha permès observar alteracions en el desenvolupament vegetatiu (e.g. arquitectura foliar) i/o

RESUM

reproductiu (e.g. morfologia del fruit) que suggereixen canvis en els nivells endògens d'hormones (e.g. auxines i gibberel·lines) estretament vinculades al desenvolupament partenocàrpic del fruit. L'anàlisi histològic ha indicat que la major part del mutants exhibeixen androesterilitat citològica, i alguns també mostren alteracions en la formació del sacs pol·linics o el desenvolupament de l'antera, un caràcter que també està vinculat amb es desenvolupament partenocàrpic del fruit. D'altra banda, s'ha comprovat que la major taxa de quallat d'alguns mutants partenocàrpics promou una major producció per planta. En alguns mutants s'ha observat una estreta relació entre l'expressió del delator i la mutació, és a dir, l'activitat GUS es detecta en els òrgans afectats. Això suggereix que el gen responsable del fenotip mutant està etiquetat per un T-DNA. Per últim, la caracterització fenotípica, genètica i molecular de plantes de la progènie de retro-encreuament del mutant *Tom24* suggereix que el fenotip és causa de un insert T-DNA que no es transmet a la descendència pel fet que provoca letalitat en ambos tipus de gàmetes (♂ i ♀).

SUMMARY

In order to identify the genes controlling developmental traits and abiotic stress tolerance in tomato, our laboratory is performing an insertion mutagenesis program, in collaboration with the groups of Dr. Rafael Lozano (Almería University) and Dr. M^a Carmen Bolarín (CEBAS-Murcia). This PhD thesis is part of our insertion mutagenesis program and aims to keep deepening in the genetic dissection of relevant traits from an agronomic perspective using the generation and characterization of tomato T-DNA lines.

With the goal of increasing the collection of tomato T-DNA lines previously generated in our group, we generated 974 new T-DNA lines. This collection of tomato T-DNA lines was evaluated in the greenhouse in order to detect dominant or semi-dominant mutants altered in vegetative and/or reproductive traits. In particular we paid special attention to mutants with changes in fruit set, since the altered genes in those mutants could play a role in the yield of tomato cultivars.

The transition from ovary to a developing fruit (i.e. fruit set), occurs once the flower has reached the anthesis stage, and depends on the pollination and fecundation. However, the fruit development can also happen independently of pollination through a process named parthenocarpy. It is known that the growth regulators, mainly auxins and gibberellins, are involved in both kinds of fruit set processes. Even so, the genetic mechanisms that trigger the transition from ovary to fruit remain largely unknown. Accordingly, tomato mutants can be a valuable tool to shed light on the molecular and genetic basis that promote pollination-dependent or independent fruit set processes.

Given the enormous interest raised by parthenocarpy, the work carried out in the context of this PhD thesis has been mainly focused on several seedless fruits mutants. The characterization of those mutants revealed alterations in vegetative plant development (e.g. leaf architecture) and/or reproductive development (e.g. fruit morphology) have been observed, suggesting that changes in endogenous levels of growth regulators (e.g. auxins and gibberellins) are closely related to the parthenocarpic fruit development. According to the histological analysis, most of the

SUMMARY

mutants showed cytological androsterility, and part of them also displayed deficiencies during the pollen sacs formation, a trait also related to parthenocarpic fruit development. Furthermore, it has been observed an increased fruit set rate in some parthenocarpic mutants leading to a higher fruit production per plant. Some mutants displayed a tight correlation between the alteration in floral whorls or fruit tissues and the expression of the GUS reporter gene included in the T-DNA, suggesting that the gen responsible of the mutant phenotype could be tagged by a T-DNA insert. Finally, the phenotypic, genetic and molecular characterization of the back-cross progeny of the *Tom24* mutant suggests that this phenotype could be a consequence of a T-DNA insert which is not transmitted to the offspring due to a lethal effect in both types of gametes (♂ and ♀).

INTRODUCCIÓN

1. EL TOMATE Y LA MEJORA
2. EL DESARROLLO FLORAL EN TOMATE
3. EL DESARROLLO DE FRUTO EN TOMATE
4. CUAJADO DE FRUTO Y PARTENOCARPIA
5. MUTAGÉNESIS INSERCIONAL

1. EL TOMATE Y LA MEJORA

El tomate es hoy en día la hortaliza más consumida a nivel mundial y por tanto la de mayor valor económico. Según fuentes de la FAO (<http://faostat3.fao.org/>), la superficie mundial del tomate en 2013 fue de más de 5 millones de hectáreas, con una producción mundial de 169,5 millones de toneladas, y un rendimiento medio de 34.698 kilos por hectárea. A título de ejemplo, el mercado del tomate en Estados Unidos, donde cada año se consume una media de 32 Kg de productos que contienen tomate, representa en torno a 2000 millones de dólares (Buckley, 2012). Por este motivo, en la actualidad se cultivan varios cientos de cultivares e híbridos de tomate que se han ido desarrollando como respuesta a la diversidad de su demanda.

En el ámbito científico, el tomate se ha convertido en un excelente modelo tanto para la investigación básica como para la investigación aplicada de plantas, en particular para el análisis de los caracteres que están relacionados con el desarrollo y la maduración de frutos carnosos. La experimentación científica se ve favorecida porque se trata de una planta autógama diploide ($2n = 24$), con un ciclo de vida corto, un elevado potencial reproductivo y de fácil polinización y propagación vegetativa. Además, su genoma es relativamente pequeño (950 Mpb) (Arumuganathan y Earle, 1991) y existen numerosas fuentes genéticas y genómicas disponibles: poblaciones cartografiadas, marcadores de DNA, colecciones de ESTs con más de 250.000 secuencias disponibles (Solanaceae EST Database, <http://biosrv.cab.unina.it/solestdb/>). También se dispone de micromatrices (TOM1, de cDNA; TOM2, de oligonucleótidos; AgilentTomatoArray y AffymetrixGeneChipTomatoGenomeArray) y bases de datos públicos (revisado por Yanoet al., 2007), así como de librerías de insertos genómicos tipo YAC (Bonemaet al., 1996) y BAC (Hamilton et al., 1999; Budimanet al., 2000).

Estos aspectos de carácter social, económico y científico hacen que el tomate sea una especie de enorme interés estratégico a la hora de identificar genes relevantes para su mejora genética. Por ello, en 2004 se decidió iniciar el programa de secuenciación del genoma de tomate (al menos de las 220 Mpb de secuencias eucromáticas situadas en las porciones distales de los brazos cromosómicos, donde se

INTRODUCCIÓN TOMATE Y MEJORA

supone que se encuentran la mayor parte de los genes) a través del consorcio internacional Solanaceae Genome Project (SOL). El objetivo de este proyecto ha sido adquirir mayor conocimiento genómico de especies de la familia de las solanáceas y de otras familias relacionadas pertenecientes al clado de las astéridas a través del recurso SOL Genomics Network (SGN). En concreto, SGN es una plataforma bioinformática comparativa destinada a contestar preguntas sobre adaptación, evolución, desarrollo, defensa, bioquímica y otras facetas relativas a este clado (Muelleret *al.*, 2005).

En el proyecto de secuenciación del genoma de tomate trabajaron 10 países. Estados Unidos secuenció tres de los doce cromosomas de tomate, en concreto los cromosomas 1, 10 y 11, mientras que los nueve países restantes se encargaron de la secuenciación de un cromosoma, a saber, Corea del Sur secuenció el cromosoma 2, China el 3, Gran Bretaña el 4, India el 5, Países Bajos el 6, Francia el 7, Japón el 8, España el 9, e Italia el cromosoma 12. Finalmente, el esfuerzo de alrededor de 300 investigadores de 14 países diferentes (ya que a los países anteriormente mencionados se sumaron Alemania, Argentina, Bélgica e Israel) hizo posible la publicación del



Figura 1. Portada de la revista *Nature* (Vol. 485, 31 de Mayo de 2012).

genoma completo del cultivar Heinz 1706 el 31 mayo 2012 en la revista *Nature* (figura 1). Hoy en día, el conocimiento de la secuencia del genoma de tomate está aportando una valiosa información acerca de la identidad genética del tomate y de su evolución como planta que produce un fruto de tipo carnoso. Se prevé que ayudará de forma notable a la mejora de diversos caracteres como el sabor del fruto, la tolerancia a estreses o la productividad, y también será útil a la hora de desarrollar nuevas variedades con características deseadas. Asimismo, la secuenciación del genoma del tomate tendrá implicaciones para otras especies. En este sentido, la información adquirida sobre los genes y las rutas implicadas en el desarrollo y la maduración del

fruto de tomate podrán ser potencialmente aplicadas a otras especies que también desarrollan frutos de tipo carnoso (Buckley, 2012).

En relación con la Mejora Genética en tomate, el principal objetivo a lo largo de los últimos 50 años ha sido el incremento de la producción de fruto por unidad de área. En realidad, este objetivo sigue siendo hoy en día uno de los prioritarios en aras de mantener la productividad frente a una demanda creciente en condiciones cada vez más adversas. De hecho, uno de los principales objetivos de la Mejora Genética está relacionado con incrementos de tolerancia que posibiliten mantener la producción de fruto en condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico. Entre los objetivos de mejora también se contemplan caracteres que sean relevantes para el agricultor, a través del desarrollo de cultivares de crecimiento determinado que ofrezcan facilidad para la separación del fruto, de maduración agrupada y buena cobertura para la cosecha mecanizada. Para que los cultivares se puedan adaptar a las necesidades y oportunidades de los mercados, se están teniendo también en cuenta caracteres relacionados con la duración del ciclo de producción y la precocidad en la maduración.

Las exigencias del consumidor también obligan a mejorar caracteres relacionados con el fruto, como puede ser la calidad externa o comercial, sobre todo en el caso de frutos para consumo en fresco (presentación, aspecto, firmeza, conservación, etc.), o el valor nutritivo, es decir, frutos con mayor concentración de metabolitos beneficiosos para la salud (antioxidantes, vitaminas, etc.). Asimismo, la calidad organoléptica, es decir, el complejo sabor-aroma-textura de la carne del fruto que se aprecia al comerlo, es un atributo que se descuidó en años pasados y que ahora empieza a ser considerado como prioritario. Últimamente se observa una preferencia por estos valores gustativos conservados en las variedades tradicionales y que se han perdido, en mayor o menor medida, en muchas de los cultivares modernos. Esto está llevando a plantear el sabor como un importante objetivo en la mejora genética del tomate.

Por otro lado, la demanda de los frutos sin semillas es cada vez mayor ya que el consumidor tiene preferencia por la parte carnosa del fruto y la industria las elimina de los preparados para evitar su sabor amargo. Por ello, el desarrollo de frutos sin

INTRODUCCIÓN TOMATE Y MEJORA

semillas es una línea de investigación de relevancia en el contexto de la Mejora Genética de Tomate, no sólo por lo que se comentaba en el párrafo anterior, sino porque el cuajado de frutos en ausencia de polinización puede significar un aumento de la producción en condiciones ambientales adversas que son desfavorables para ese proceso. Además, la vida útil de un fruto sin semillas es mayor debido a que estas producen hormonas que promueven senescencia. En definitiva, el conocimiento de los mecanismos que conducen al cuajado de fruto partenocárpico entraña un enorme interés tanto desde un punto de vista científico como aplicado.

2. EL DESARROLLO FLORAL EN TOMATE

2.1. Morfología de la flor de tomate

La flor de tomate es perfecta, regular e hipógina. Es hermafrodita y está formada por cuatro verticilos (figura 2B). El primero consta de 6 sépalos, el segundo tiene un número similar de pétalos, el tercero se compone de 6 estambres que, dispuestos de forma helicoidal, forman un cono estaminal que envuelve el cuarto verticilo, formado por un número variable de carpelos fusionados en pistilo. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racimoso (dicasio) (Quinet y Kinet, 2007) (figura 2A). La inflorescencia, que es típicamente determinada, está compuesta por 5-10 flores (Allen y Sussex, 1996).

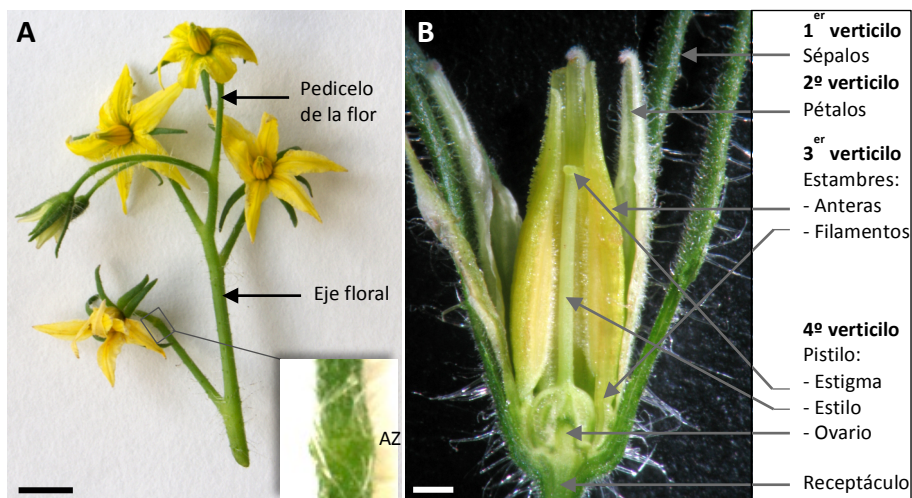


Figura 2. Estructuras florales de tomate (cv. Moneymaker). A: inflorescencia de tomate y detalle de un pedicelo floral a la altura de la zona de abscisión AZ. B: sección longitudinal de una flor en estado de preantesis.

Escala de las barras: A: 1cm; B: 1mm.

Las flores se unen al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene una zona de abscisión, o zona AZ (por *abscission zone*), distinguible por un engrosamiento con un pequeño surco originado por una reducción del espesor del córtex (Butler, 1936) (ver figura 2A). Cuando no se produce el cuajado del fruto, como consecuencia de la ausencia de polinización o fecundación, la flor se separa directamente de la inflorescencia por la zona AZ (Iwaie *et al.*, 2013). En el caso de que el fruto cuaje y se desarrolle, se producirá un engrosamiento de la zona de abscisión que permitirá que el fruto se separe fácilmente de la inflorescencia tras la maduración.

2.2. Etapas del desarrollo floral

La flor es el resultado de tres acontecimientos fisiológicos. El primero es la transición a la floración, vinculando la conversión del meristemo vegetativo apical en un meristemo de inflorescencia. En el segundo tiene lugar la emergencia del meristemo floral a partir del meristemo de inflorescencia, dando lugar a la primera flor. En el tercer acontecimiento se establece la arquitectura de los distintos órganos de la flor a partir del meristemo floral.

Durante la transición a la floración el meristemo de inflorescencia se transforma en un meristemo floral, desarrollándose al mismo tiempo un nuevo meristemo de inflorescencia que repetirá ese patrón de desarrollo varias veces. El proceso culmina con la producción de una flor terminal. Estas iteraciones del desarrollo conducirán finalmente a una inflorescencia de tipo racimoso (Sawhney y Greyson, 1972; Allen y Sussex, 1996) en la que se pueden apreciar los diferentes estadios del desarrollo floral (figura 2A). En paralelo, un nuevo meristemo simpodial emerge de la axila de la última hoja (Szymkowiak e Irish, 2005). Mientras se está desarrollando la primera inflorescencia, el nuevo meristemo simpodial experimenta un crecimiento vegetativo limitado que culmina con la conversión en un meristemo de inflorescencia, momento en el que inicia el desarrollo de otro meristemo simpodial. Este proceso repetitivo define el crecimiento simpodial indeterminado del tomate.

Por lo que respecta a los diferentes estadios del desarrollo de la flor, el meristemo floral da lugar a un botón floral temprano de pequeño calibre que va creciendo en tamaño a medida que se van desarrollando los diferentes órganos florales (figura 3). Cuando se inicia la apertura de los sépalos y los pétalos, la flor se encuentra en el estadio de preantesis y el cono estaminal aún exhibe un color verde. En el estadio de antesis, los pétalos de la flor experimentan una apertura mínima de 180° y el cono estaminal se torna de color amarillo. Es en este estadio cuando tiene lugar la polinización toda vez que los gametos han alcanzado la plena madurez. Para que esto ocurra, se tiene que producir la apertura de los sacos polínicos, lo que permite la salida de los granos de polen y su migración hacia el estigma. Esta etapa es fácilmente reconocible a nivel morfológico y es bastante puntual (alrededor de un día).

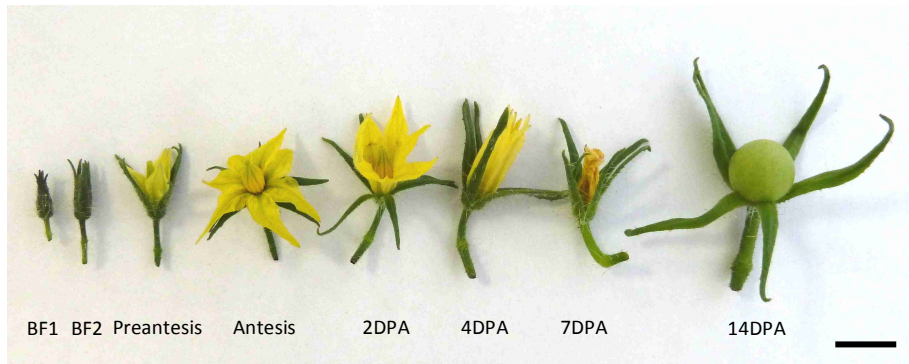


Figura 3. Distintos estadios de desarrollo de la flor de tomate.
BF1= botón floral temprano; BF2= botón floral tardío; n DPA= n días postantesis.
Escala de la barra: 1cm.

Tras la fertilización de los óvulos, los carpelos se transforman en un órgano complejo que da lugar a un fruto. A partir de este momento, el ovario, los sépalos, el pedicelo y la zona AZ aumentan su tamaño, mientras que los pétalos, el cono estaminal y el resto del pistilo (estigma y estilo) experimentan un proceso de senescencia y acaban desprendiéndose del receptáculo floral. Catorce días después de la antesis (14 DPA) el ovario ha experimentado un crecimiento considerable y se ha transformado en un fruto de aproximadamente 1 cm de diámetro (figura 3).

2.3. El modelo ABC (DE) en tomate

A principios de los 90s, los análisis genéticos en *Arabidopsis* y *Antirrhinum* permitieron proponer un modelo con tres funciones génicas (A, B y C), en cada una de las cuales interviene un número reducido de genes que actúa en solitario o a través de interacciones para determinar identidad de los órganos florales en los cuatro verticilos. El denominado modelo ABC (Coen y Meyerowitz, 1991; Meyerowitz *et al.*, 1991) asume que mutaciones que afecten a genes de la clase A, B o C promueven cambios homeóticos en los órganos florales de dos verticilos consecutivos (figura 4). La mayoría de los genes ABC forman parte de la familia de factores de transcripción MADS-box, altamente conservados entre especies. Las proteínas MADS se unen al DNA en forma de complejos multiméricos, controlando de esa forma el desarrollo de los órganos florales (Robles y Pelaz, 2005).

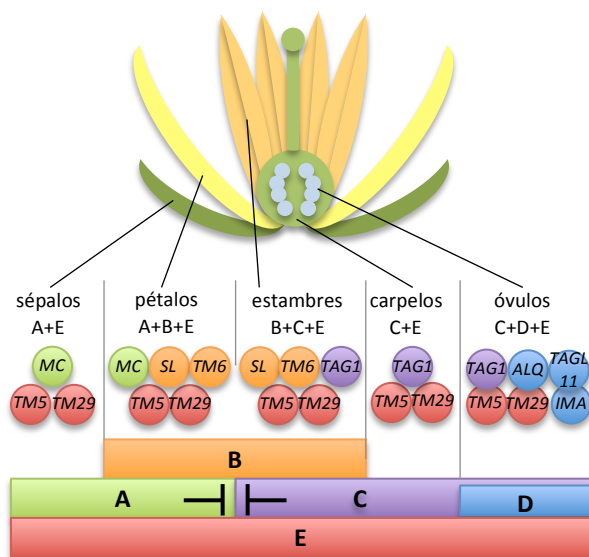


Figura 4. Modelo ABC (DE): control genético del desarrollo de los órganos florales. En el modelo ABC, los genes de cada clase intervienen en la identidad de dos verticilos consecutivos. Los genes A y C son antagonistas; en ausencia de la función A, los genes C actúan en los 2 primeros verticilos de la misma forma que en los dos verticilos internos, y a la inversa. Los genes D controlan la formación de óvulos. Los genes E intervienen en la formación de todos los verticilos florales. El color de cada círculo hace referencia al tipo de gen identificado en tomate (ver tabla 1).

El posterior descubrimiento de dos nuevas clases de genes obligó a extender el modelo ABC. Los genes de clase D, que controlan la identidad de los óvulos, se describieron por primera vez en petunia (Angenent *et al.*, 1995). Asimismo, se ha podido comprobar que los genes de clase A, B y C requieren una función adicional para

que se produzca el adecuado desarrollo de los cuatro verticilos florales. Esa función la llevan a cabo los genes *SEPALLATA (SEP)* que pertenecen a la clase E (figura 4). En la tabla 1 se describen diferentes genes de identidad floral que se han identificado en tomate hasta la fecha.

Tabla 1. Mutantes y genes de tomate implicados en el desarrollo de la flor (adaptado de Lozano *et al.*, 2009).

Mutante o gen	Fenotipo	Gen	Referencia	Ortólogo de <i>Arabidopsis</i>	
Clase A <i>macrocalyx (mc)</i>	Sépalos largos, inflorescencia indeterminada	<i>LeMADS-MC (MC)</i>	Rick y Sawant, 1955; Vrebalov <i>et al.</i> , 2002	<i>APETALA1</i>	
Clase B <i>stamenless (sl)</i>	Conversión homeótica de pétalos y estambres en sépalos y carpelos, respectivamente	<i>SL</i>	Nash <i>et al.</i> , 1985; Gómez <i>et al.</i> , 1999	<i>APETALA3</i>	
	<i>TM6</i>	El silenciamiento de <i>TM6</i> altera el desarrollo de estambres	<i>TM6</i>	De Martino <i>et al.</i> , 2006	<i>APETALA3-like</i>
Clase C <i>TAG1</i>	La anulación de función de <i>TAG1</i> ocasiona transformaciones homeóticas de estambres y carpelos	<i>TAG1</i>	Pnueli <i>et al.</i> , 1994a	<i>AGAMOUS</i>	
Clase D <i>arlequín (alq)</i>	<i>TAGL1</i> está implicado en el proceso de maduración del fruto de tomate	<i>ALQ (TAGL1)</i>	Vrebalov <i>et al.</i> , 2009; Itkin <i>et al.</i> , 2009; Giménez <i>et al.</i> , 2010	<i>SHP1 (AGL1)</i>	
	<i>TAGL11</i>	nd	<i>TAGL11</i>	Busi <i>et al.</i> , 2003)	<i>STK (AGL11)</i>
	<i>INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY (IMA)</i>	El silenciamiento de <i>IMA</i> impide la formación de tejido gametofítico, reemplazado por tejido esporofítico	<i>IMA</i>	Sicard <i>et al.</i> , 2008	<i>MIF2</i>
Clase E <i>TM5</i>	Su ausencia de función altera la diferenciación de órganos en los tres verticilos internos	<i>TM5</i>	Pnueli <i>et al.</i> , 1994b	<i>SEPALLATA3</i>	
	<i>TM29</i>	La anulación de función de <i>TM29</i> afecta al mantenimiento de la identidad del meristemo floral (alteración en los tres verticilos internos)	<i>TM29</i>	Ampomah-Dwamena <i>et al.</i> , 2000	<i>SEPALLATA3</i>

2.4. Desarrollo de las anteras y del polen

En tomate se han identificado algunos mutantes de clase B que exhiben transformaciones parciales o completas en el segundo y tercer verticilo de la flor (Nash *et al.*, 1985; Sawhney, 1992). Por ejemplo, los mutantes alélicos *stamenless (sl)* y *corollaless (cl)* desarrollan sépalos en vez de pétalos en el segundo verticilo y carpelos en vez de estambres en el tercer verticilo (Gómez *et al.*, 1999). *SL*, un gen de clase B, es el ortólogo de *DEFICIENS (DEF)* de *Antirrhinum* y *APETALA3 (AP3)* de *Arabidopsis*, ambos implicados en el desarrollo de pétalos y estambres. *TAP3*, otro gen de tomate de clase B, es ortólogo de *AP3* pero perteneciente al linaje *euAP3*. Este gen se clonó a partir de un mutante (*tap3*) identificado en la colección de líneas de inserción con el sistema *Ac/Ds* obtenida por el grupo de Avraham Levy (Meissner *et al.*, 2000). *TAP3* codifica un factor de transcripción de la familia MADS-box requerido para la especificación de la identidad de pétalos y estambres (de Martino *et al.*, 2006). Las diferencias entre los mutantes *sl* (semidominante y sensible a temperatura) y *tap3* (recesivo) sugieren la posibilidad de que *sl* represente una mutación neomórfica en el locus *TAP3* (de Martino *et al.*, 2006). En tomate, a diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis*, existen dos linajes parálogos de clase B: *euAP3* y *TM6 (TOMATO MADS BOX)*, abreviado como *TM* o *TDR*. Los genes *TAP3* y *TM6* poseen funciones diferentes, aunque parcialmente redundantes, que pueden ser adscritas a sus dominios de expresión (de Martino *et al.*, 2006). Se ha comprobado que la pérdida de función de *TAP3* da lugar a transformaciones homeóticas en pétalos y estambres, mientras que la anulación de función de *TM6* conduce principalmente a cambios homeóticos en estambres. Según de Martino *et al.* (2006), la función ancestral del linaje *AP3* estaba relacionada con la especificación de la identidad de los estambres, pero una duplicación y diversificación de este linaje condujo a la adquisición de funciones relacionadas con la especificación de la identidad de pétalos.

Hasta la fecha no se han descrito mutantes de tipo C en tomate, es decir, mutantes con cambios homeóticos en los órganos reproductivos. Sin embargo, se ha clonado el gen *AGAMOUS1* de tomate (*TAG1*), un ortólogo del gen *AGAMOUS (AG)* de *Arabidopsis*. Los fenotipos de las plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan o

silencian el gen *TAG1* corroboran el papel que desempeña este gen en la especificación de la identidad de los estambres y carpelos (Pnueli *et al.*, 1994a).

Conviene indicar que los genes anteriormente descritos parecen estar implicados en las rutas de regulación de citoquininas y giberelinas (GAs). El papel fundamental de estas fitohormonas en el establecimiento de órganos florales masculinos ha sido demostrado en numerosas especies, llegándose incluso a promover la formación de flores masculinas en especies dioicas como el cáñamo (*Cannabis sativa*), espinaca (*Spinacia oleracea*) o pepino (*Cucumis sativus*) mediante la aplicación exógena de GAs (Mitchell y Wittwer, 1962; Pike y Peterson, 1969; MohanRam y Jaiswal, 1962). En el mutante de tomate *stamenless-2* (*sl-2*), los niveles endógenos de citoquininas y GAs son menores que en el WT (Sawhney, 1974; Sawhney y Shukla, 1994). También se ha comprobado que los mutantes de tomate deficientes en GAs *gib-1* y *gib-2* son incapaces de desarrollar conos estaminales normales y, por tanto, son androestériles. Sin embargo, su fertilidad puede ser restaurada mediante aplicación exógena de GAs (Nester y Zeevaart, 1988; Jacobsen y Olszewski, 1991). Desde el momento en el que se ha sabido que estos reguladores de crecimiento intervienen en el desarrollo de los órganos florales se ha podido estudiar el papel que desempeñan de manera específica en ciertos tejidos mediante ingeniería genética. Así, la transferencia a maíz, *Arabidopsis* y tabaco de genes que bloquean la síntesis de citoquininas (*CKX1* en maíz) y de giberelinas (*gai*, en *Arabidopsis* y tabaco) condujo al aborto de las anteras y del polen (Huang *et al.*, 2003).

Además de las citoquininas y giberelinas, las auxinas, el ácido jasmónico y el etileno parece que también intervienen en el desarrollo de las anteras. Según Spena *et al.* (1992), un aumento de la concentración de auxinas en anteras en las primeras etapas de su formación promueve un descenso de la actividad de las giberelinas alterando su desarrollo. También se ha comprobado que en el mutante androestéril de tomate *sl-2*, reversible mediante aplicación exógena de GAs, la reducción de ácido indolacético como consecuencia de bajas temperaturas restaura la fertilidad de anteras sin la necesidad de que se apliquen GAs (Singh y Sawney, 1991). Así pues, se piensa que la actividad de las GAs en el desarrollo de anteras está modulada por

auxinas y citoquininas. Adicionalmente, se ha reportado que el ácido jasmónico y el etileno están implicados en la maduración del polen, la dehiscencia de la antera y la antesis de la flor (Sanders *et al.*, 2000; Ishiguro *et al.*, 2001; Rieu *et al.*, 2003).

Los mutantes *sl*, *tap3* o *sl-2* son androestériles bien por anomalías en la estructura de la antera o porque la antera no se desarrolla. Sin embargo, se han descrito otros mutantes que desarrollan anteras aparentemente normales, pero que no tienen polen o no es funcional. Este tipo de mutantes presenta, por tanto, una androesterilidad de tipo esporógena.

En el fenotipo silvestre, la formación del polen en los lóculos de las anteras tiene lugar a través de dos fases: la microsporogénesis y la microgametogénesis. Durante la microsporogénesis, el tejido esporógeno diploide de los microsporocitos o células madres de polen (PMC, por *pollen mother cells*) origina, a través de la meiosis, tétradas de microsporas que se encuentran encerradas en una espesa pared de calosa. En una etapa posterior se produce la reabsorción de la calosa, lo que permite la liberación de las microsporas como consecuencia de un complejo enzimático (calasa) que es secretado por el tapete o *tapetum*, la capa celular más interna del esporofito que bordea los lóculos de las anteras (Scott *et al.*, 2004). En la fase de microgametogénesis, la microspora experimenta un crecimiento celular notable debido a la síntesis de las paredes celulares (exina e intina), la génesis de la vacuola y eventos de fusión (Owen y Makaroff, 1995; Yamamoto *et al.*, 2003). En paralelo, el núcleo migra hacia la pared celular y la microspora polarizada experimenta una primera mitosis haploide (PMI, por *pollen mitosis I*) altamente asimétrica que da lugar a un grano de polen binucleado que contiene dos células: la vegetativa y la generativa o espermática, que se encuentra encerrada dentro de la primera (figura 5). Durante la maduración del grano de polen se produce una deshidratación progresiva que da lugar a una ligera reducción de volumen (Firon *et al.*, 2012).

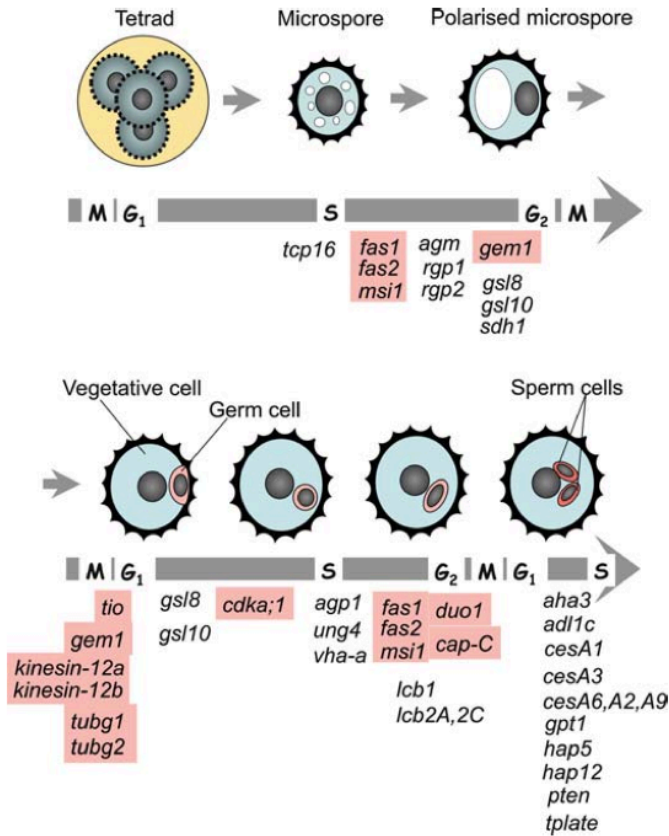


Figura 5. Genes implicados en el desarrollo del gametofito masculino de *Arabidopsis* (adaptado de Twell, 2010). En *Arabidopsis*, el grano maduro de polen es trinucleado, ya que la segunda mitosis ocurre antes de que se produzca la liberación del grano de polen. Sin embargo, en tomate el grano maduro de polen es binucleado ya que la segunda mitosis ocurre tras la polinización, en concreto durante la germinación del tubo polínico.

La primera mitosis haploide es un evento de referencia en el desarrollo del polen toda vez que da lugar a dos células con estructuras y destinos diferentes. La célula vegetativa acumula reservas (carbohidratos y/o lípidos) necesarias para la germinación del tubo polínico (Pacini, 1996). Por su parte, la célula generativa experimenta una segunda mitosis (PMII) formando dos núcleos espermáticos que fecundarán a la oósfera y a los dos núcleos polares de la célula central del saco embrionario durante la doble fertilización de las angiospermas. En *Arabidopsis* y maíz, el grano maduro de polen es trinucleado ya que la segunda mitosis ocurre antes de que tenga lugar la liberación de los granos de polen. Sin embargo, en tomate se produce una vez que el tubo polínico se ha formado, es decir, el grano maduro de polen es binucleado (Ma *et al.*, 2005).

En *Arabidopsis* se han empleado diversas estrategias de escrutinio para seleccionar mutantes alterados en el desarrollo del gametofito masculino a fin de identificar genes implicados en el desarrollo del polen. Recientemente se han identificado en esta especie en torno a 50 mutantes gametofíticos así como 37 genes que afectan el desarrollo post-meiótico del gametofito masculino antes de la liberación del polen (ver figura 5; Twell, 2010).

En tomate se conocen pocos genes implicados en la formación de polen, aunque se han caracterizado algunos mutantes alterados en este proceso. Los trabajos de Sheoran *et al.* (2009) desvelaron que el polen del mutante de tomate androestéril *7B-1* colapsa antes de la meiosis de los microsporocitos. También se ha observado que el mutante de tomate *pmcd1* (*pre-meiotic cytokinesis defect 1*) forma gametos diploides debido a una endomitosis ectópica en los microsporocitos antes de que se produzca la meiosis (De Storme y Geelen, 2013). Por otro lado, se ha descrito que el gen de tomate *LeProT1*, un homólogo de un transportador de prolina en *Arabidopsis*, se expresa de manera específica tanto en el grano de polen maduro como durante su germinación. Se ha sugerido que *LeProT1* facilita la integración de la prolina y de solutos compatibles necesarios para el desarrollo y desecación del polen (Schwacke *et al.*, 1999). También se sabe que la actividad del gen *LAT32*, que codifica una proteína glicosilada resistente al calor, es necesaria para la hidratación del polen y/o su germinación (Muschiattiet *al.*, 1994). David-Schwartz *et al.* (2013) observaron que los genes *fructokinase 4* (*SIFRK4*), relacionados con el metabolismo de los azúcares, y *LIN7*, que codifica una invertasa, se co-expresan en polen maduro y durante la germinación. Los autores sugieren que esta expresión conjunta regula el mecanismo a través del cual se administran los carbohidratos al gametofito masculino durante los últimos estadios de su desarrollo.

El tapete desempeña un papel clave durante la microgametogénesis (Parish y Li, 2010). En efecto, este tejido esporofítico que degenera a lo largo del proceso participa en la nutrición de las microsporas (Shivanna y Johri, 1985; Chapman, 1987; Pacini, 1990). Asimismo, secreta enzimas (calasa) que conducen a la liberación de las microsporas y participa en la formación de los precursores de la exina, como la

esporopolenina (Echlin, 1971; Pacini *et al.*, 1985). Por tanto, cualquier alteración que se produzca en el tapete afecta al desarrollo del polen. Recientemente se ha demostrado que el gen de tomate *SLCER6*, ortólogo del gen de *Arabidopsis CER6* (*ECERIFERUM6*), es esencial para regular la degradación del tapete (Smirnova *et al.*, 2013). La ausencia de actividad de este gen afecta a la fertilidad masculina tanto en *Arabidopsis* como en tomate, aunque el mecanismo a través del cual opera parece ser diferente. En *Arabidopsis*, *CER6* interviene en la síntesis de lípidos de la pared del polen, y parece que de estos lípidos depende la correcta hidratación del grano de polen. Sin embargo, en tomate la hidratación de los granos de polen no depende de los lípidos de la pared. La correcta formación de la exina del grano de polen de tomate es fundamental para su funcionalidad y supervivencia. *LeGRP92* codifica una proteína rica en glicina (GRP, por *glycine-rich protein*) que se produce específicamente en el *tapetum* y que se acumula en el grano polen desde el estadio de microsporocito hasta el de dehiscencia de las anteras (McNeil y Smith, 2010). La ausencia de funcionalidad de *LeGRP92* conduce a anomalías en la formación de la exina y a una reducción tanto de la viabilidad de los granos de polen como de su germinación. También se ha reportado que tres genes tipo S-adenosyl metionina decarboxilasa (*SAMDC1*, *SAMDC2* y *SAMDC3*) desempeñan un papel importante en el *tapetum* (Sinha y Rajam, 2013). Se sabe que los genes *SAMDC* están implicados en la síntesis de poliaminas e intervienen tanto en la inducción y diferenciación floral como en la regulación de la fertilidad. Sinha y Rajam (2013) comprobaron que el silenciamiento específico en *tapetum* de los tres genes *SAMDC* afecta a la fertilidad del polen. También se ha comprobado que el gen *5B-CRP*, que codifica una proteína rica en cisteína, se acumula en el *tapetum* desde la premeiosis hasta la liberación de las tétradas y que su función podría estar relacionada con la regulación de la actividad del proteasoma en el lóculo de la antera (McNeil y Smith, 2005). Por otro lado, la función del gen *LIN7*, que codifica una invertasa, está relacionada con el suministro de carbohidratos para la nutrición del polen y se expresa de forma específica en el *tapetum* y en grano maduro de polen bajo el control de GAs (Proels *et al.*, 2006).

Además del *tapetum*, otras capas celulares que constituyen la antera son igualmente importantes para el desarrollo reproductivo masculino. Por ejemplo, ciertos mutantes desarrollan anteras con polen funcional; sin embargo, se consideran androestériles debido a que no se produce la apertura de los sacos polínicos y, por ende, la polinización. Es el caso de los mutantes *positional sterile (ps)* (Larson y Paur, 1948) y *positional sterile-2 (ps2)* (Tronickova, 1962), ambos con anteras indehiscentes debido a una alteración en el estomio. El mutante *ps* exhibe fusión de pétalos y un fenotipo parecido al del mutante *lecer6*, aunque todavía no se ha realizado el ensayo de alelismo para determinar si los alelos mutantes pertenecen al mismo gen o a genes distintos (Leide *et al.*, 2011). Por lo que respecta al mutante *ps-2*, se sabe que la mutación afecta a un gen implicado en la síntesis de poligalacturonasa (Gorguet *et al.*, 2009). Recientemente, Senatore *et al.* (2009) identificaron, secuenciaron y caracterizaron el gen *SICysEP*, que codifica una cisteínasa con cola KDEL. Según los autores el gen está implicado en la dehiscencia de las anteras y se acumula en los tejidos esporofíticos rodeando los lóculos de las anteras.

2.5. Desarrollo de los óvulos y del ovario

Teniendo en cuenta la importancia de los carpelos como órganos sexuales de la flor, protegiendo a los óvulos y permitiendo la formación de las semillas, se ha dedicado mucho esfuerzo para identificar genes y proteínas implicados en la regulación del desarrollo del carpelo. En *Arabidopsis*, el gen *AG* determina la identidad del carpelo, aunque requiere de la actividad de genes *SEPALLATA* (Pelaz *et al.*, 2000). No obstante, se ha demostrado que se pueden desarrollar órganos carpeloides en ausencia de actividad de *AG*, lo que sugiere que deben existir rutas adicionales independientes de *AG* que pueden especificar el desarrollo del carpelo (Pinyopich *et al.*, 2003). *SHATTERPROOF1 (SHP1)*, *SHP2* y *SEEDSTICK (STK)* son los genes que parece que actúan en estas rutas. De hecho, *AG* actúa de forma redundante con los genes *SHP* promoviendo el desarrollo del carpelo. Por otra parte, *AG*, *SHP* y *STK* desempeñan papeles redundantes en la especificación de la identidad del óvulo (Liljegren *et al.*, 2000; Favaro *et al.*, 2003; Pinyopich *et al.*, 2003). Aunque no se han demostrado

interacciones proteína-proteína entre los genes *AG*, *SHP* y *STK*, los tres interactúan con *SEP3*, lo que sugiere que las proteínas SEP median en la formación de un complejo proteico implicado en especificar la identidad de óvulo y carpelo (Favaro *et al.*, 2003). Mediante la sobreexpresión y anulación de función de los genes MADS-box *FBP7* y *FBP11*, dos ortólogos de *STK* en petunia, se han confirmado sus funciones específicas en óvulos y sus interacciones con las proteínas tipo SEPALLATA *FBP2*, *FBP5* y *FBP9* (Angenent *et al.*, 1995; Ferrario *et al.*, 2003).

En tomate, algunos homólogos de los genes mencionados en el párrafo anterior están implicados en el desarrollo de los óvulos y los carpelos. En efecto, los genes tipo *SEPALLATA TM5* y *TM29 (TAGL2)* regulan la identidad de los órganos florales y el desarrollo del fruto (Pnueli *et al.*, 1994b; Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002). La ausencia de función de estos genes *SEP* da lugar a alteraciones homeóticas en los tres verticilos internos parecidas a las que se producen en plantas transgénicas de petunia que no expresan los genes *FBP2* y *FBP5*. Tras la fertilización, la expresión de *TM29* queda confinada al ovario, especialmente en semillas en desarrollo y haces vasculares, lo que relaciona el proceso de post-fertilización con la formación del fruto.

TAG1, el ortólogo de *AG* en tomate, se requiere para el adecuado desarrollo de los carpelos en el cuarto verticilo floral (Pnueli *et al.*, 1994a). Se han aislado otros genes MADS-box tipo *AG* que se expresan a lo largo del desarrollo del fruto de tomate. Es el caso de *ARLEQUÍN (ALQ / TAGL1)* y *TAGL11*, cuyas secuencias de nucleótidos comparten una elevada similitud con *SHP1 (AGL1)* y *STK (AGL11)* respectivamente (Busi *et al.*, 2003; Giménez *et al.*, 2010). Los patrones de expresión de *ALQ* y *TAGL11* son muy similares, y sus transcritos se detectan primordialmente en los integumentos interiores del óvulo y las paredes del carpelo. Estos resultados sugieren funciones solapadas de los dos genes en la especificación de la identidad de óvulo y en el control del desarrollo del fruto, tal y como ocurre con sus homólogos *SHP1* y *STK* en *Arabidopsis*. Experimentos llevados a cabo en levadura han revelado la formación de dímeros entre *TM29* y *TAG1*, así como entre *ALQ* y *TAGL11*. Todos estos datos parecen indicar que las proteínas codificadas por estos cuatro genes desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión génica durante los primeros estadios del

desarrollo del fruto, funcionando juntos como complejos transcripcionales (Busi et al., 2003). A pesar de que se trata de diferentes tipos de frutos (silicuas en *Arabidopsis*, bayas en tomate), los genes mencionados anteriormente comparten en ambas especies similitudes en estructura y función, así como patrones de expresión e interacciones comparables, lo que parece indicar que las rutas moleculares relacionadas con el desarrollo del fruto están muy conservadas (Lozano et al., 2009).

El desarrollo de una flor como una estructura verticilada y determinada implica que la determinación del meristemo floral podría ocurrir desde el momento en el que se ha adquirido la identidad del carpelo. En *Arabidopsis*, este proceso está regulado por *WUSCHEL (WUS)* y *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* operando en diferentes dominios meristemáticos. El cese de la actividad en el meristemo floral depende de un proceso de retro-alimentación en el que están presentes los genes *WUS*, *LFY* y *AG*, de forma que los dos primeros activan la expresión de *AG*, pero cuando se ha completado el desarrollo de los órganos florales, *AG* reprime la actividad de *WUS* (Lohmann et al., 2001). En petunia, la formación de complejos multiméricos entre factores de transcripción MADS-box de las clases C, D y E podría ser responsable de la represión de *TERMINATOR*, el gen homólogo a *WUS* en esta especie (Ferrario et al., 2006). Por lo que respecta a tomate, la anulación de función de *TAG1* promueve la indeterminación de la flor y sustitución de los carpelos por estructuras florales ectópicas. Tales cambios homeóticos confirman el papel que desempeña *TAG1* en la determinación del meristemo floral (Pnueli et al., 1994a). Por otra parte, el gen *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY (IMA)*, que codifica una proteína MIF (*mini zinc finger*), participa en la determinación del meristemo floral y la iniciación del primordio de óvulo activando la expresión de genes de clase D (Sicard et al., 2008). *IMA* inhibe la proliferación celular durante la determinación del meristemo floral, controla el número de carpelos durante el desarrollo floral y actúa como un represor de *SIWUSCHEL (SIWUS)*, el gen organizador del meristemo en tomate.

3. EL DESARROLLO DE FRUTO EN TOMATE

Tras el establecimiento de la arquitectura de la flor y la formación de los gametos, el desarrollo del fruto depende del éxito de la polinización y la fecundación (Gillaspi, 1993). La fertilización del óvulo permite que el ovario reanude su crecimiento y experimente diversos cambios metabólicos para dar lugar a un fruto.

3.1. Morfología del fruto de tomate

El fruto de tomate es una baya globosa y redondeada, de color generalmente rojo en su maduración, compuesta por dos o más lóculos separados por el septo (figura 6). Las paredes del fruto están compuestas por el pericarpio que consta de tres capas: exocarpo, mesocarpo y endocarpo. El endocarpo, que consta de una sola capa celular, es la parte más interna del pericarpio y es adyacente al lóculo. El mesocarpo, o parte intermedia, constituye gran parte del pericarpio; consta de varias capas de células parenquimáticas muy vacuoladas y abarca los haces vasculares. La capa más externa, el exocarpo, está formada por varias capas de células colenquimáticas y una capa de células epidérmicas cubiertas por una cutícula cérea (Joubès *et al.*, 2000; Lemaire-Chamley *et al.*, 2005; Mintz-Oron *et al.*, 2008). La estructura del septo es similar a la del pericarpio, aunque sus capas externas son como las del endocarpo, es decir, no posee exocarpo. Las cavidades locales del fruto contienen las semillas, que se encuentran embebidas en un tejido gelatinoso que las protege y que se denomina mucílago. La parte central del fruto está constituida por un tejido menos pigmentado denominado columela donde convergen los haces vasculares del fruto que proceden del pedicelo. Rodeando periféricamente la columela se encuentra la placenta, a la que se unen las semillas mediante el funículo. Las semillas tienen forma lenticular, con un diámetro de 3 a 5 mm y están constituidas por el embrión, el endospermo y la testa o cubierta seminal. El embrión, a su vez, contiene la yema apical, dos cotiledones, el hipocotilo y la radícula.



INTRODUCCIÓN DESARROLLO DEL FRUTO

El fruto tiene dos sistemas vasculares principales que parten del pedicelo: uno que se extiende por el pericarpio (sistema vascular periférico) y el otro que va a las semillas a través de las paredes radiales y la columela (sistema vascular central). El sistema vascular se compone principalmente de tubos de floema y vasos de xilema con presencia de traqueidas (Medina, 2010).

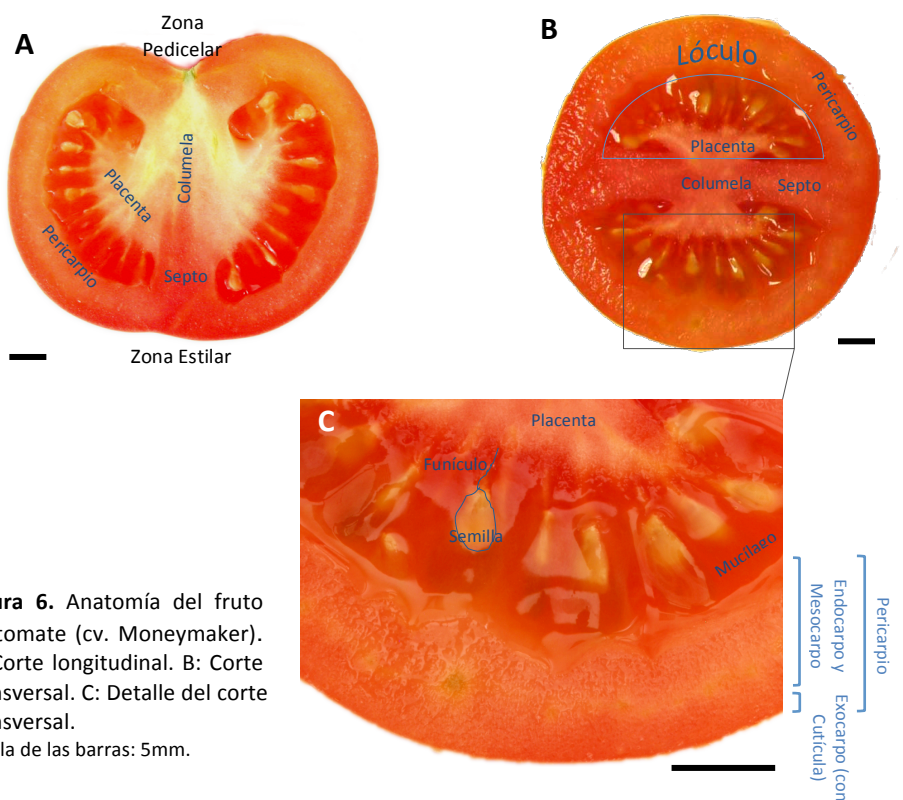
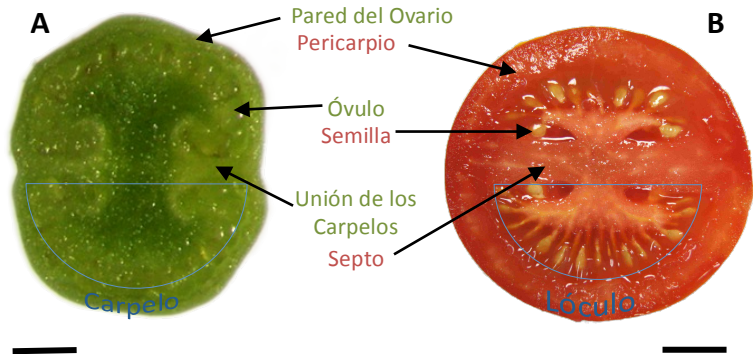


Figura 6. Anatomía del fruto de tomate (cv. Moneymaker). A: Corte longitudinal. B: Corte transversal. C: Detalle del corte transversal. Escala de las barras: 5mm.

3.2. Etapas del desarrollo de fruto

El fruto es la consecuencia de la transformación de un ovario, es decir, el septo se desarrolla a partir de la fusión de dos paredes adyacentes de carpelos (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005), la pared del ovario se convierte en pericarpio de fruto y los óvulos fertilizados por el polen dan lugar a semillas cuya testa deriva del tegumento que rodea inicialmente el óvulo (Smith, 1935; Gillaspay *et al.*, 1993; Chamarro, 1995; Ohad *et al.*, 1996) (figura 7).

Figura 7. Ovario (A) y fruto (B) de tomate (secciones transversales). Escala de las barras: A: 0,5mm; B: 1cm.



Según Srivastava y Handa (2005), el desarrollo del fruto de tomate se divide en cuatro fases (figura 8) que incluyen las etapas de prepolinización, polinización, fertilización y cuajado, post-cuajado o desarrollo temprano, maduración y senescencia. En la fase I ocurre el desarrollo floral, la polinización, la fertilización (o fecundación) y el cuajado de fruto. Este último está relacionado con la decisión de seguir con el desarrollo del ovario (en fruto) o abortar en caso de que no se produzca la fecundación. A lo largo de la fase I, el primordio reproductivo se diferencia en un carpelo completamente desarrollado. Se trata de un periodo mitóticamente activo que termina temporalmente cuando la flor alcanza el estadio de antesis.

Tras la fertilización, en la fase II se desencadenan nuevas divisiones celulares que tienen una duración de 7 a 14 días (Mapelli *et al.*, 1978). A lo largo de esta fase se establecen muchas de las células propias del fruto en un contexto en el que el crecimiento es lento, no llegando a representar más del 10% del peso final que alcanzará el fruto (figura 8).

INTRODUCCIÓN DESARROLLO DEL FRUTO

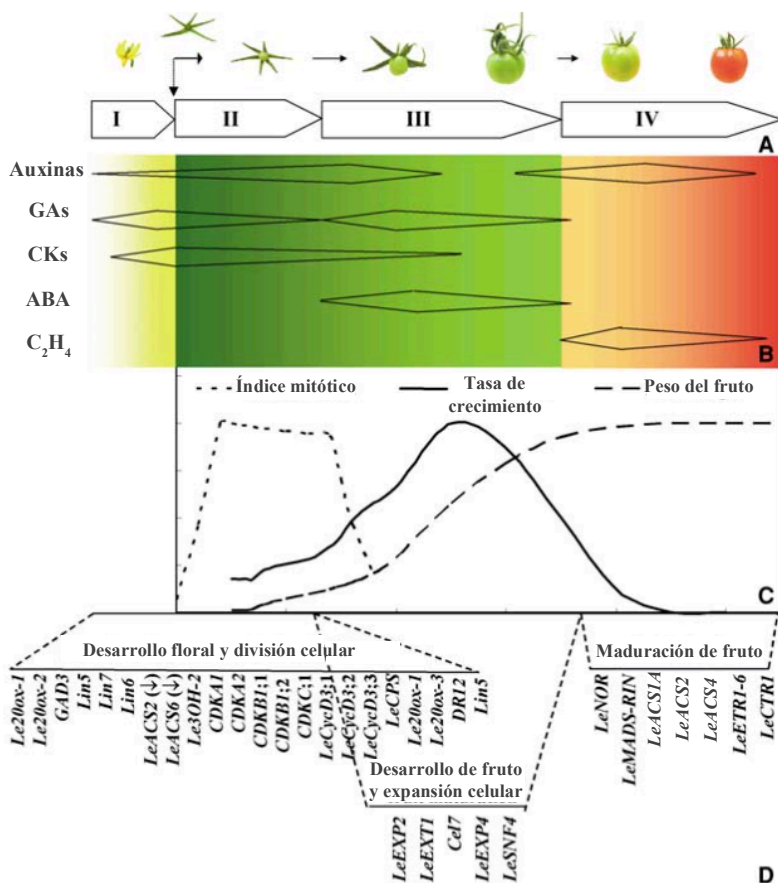


Figura 8. Desarrollo del fruto de tomate y su regulación hormonal (adaptado de Srivastava y Handa, 2005). A y B: las cuatro fases de desarrollo del fruto y los flujos hormonales durante estas fases (el cuajado está representado por la doble flecha en ángulo recto, momento en el que termina la fase I). C: índice mitótico, tasa de crecimiento y peso del fruto. D: algunos de los genes cuya expresión está asociada con cambios hormonales a lo largo del desarrollo del fruto (la flecha al lado de algunos genes indica una regulación corriente abajo de los mismos).

La fase III viene definida por un cambio progresivo de división celular a expansión celular (figura 8). En función del genotipo, la expansión celular dura de 6 a 7 semanas hasta que el fruto alcanza el estadio verde maduro, momento en el que el tamaño es definitivo (Guillaspy *et al.*, 1993). Conviene indicar que el tamaño final del fruto es dependiente del número de células que se alcanza en la fase II (Ho, 1996), aunque también depende del número de células del ovario antes de la fertilización, del número de fertilizaciones exitosas que ocurran en el ovario y de la capacidad de

expansión celular (Bohner y Bangerth, 1988). Esta fase va acompañada de un proceso de endoreduplicación, es decir, de una multiplicación del genoma sin mitosis que provoca un aumento de hasta 8 veces el contenido de ADN por célula al final del desarrollo del fruto (Bergervoet *et al.*, 1996).

En la fase IV acontecen procesos de maduración y senescencia. Al inicio de esta fase la semilla se encuentra completamente desarrollada, por lo que el fruto pierde la función de protección y pasa a ser un agente de dispersión. Por otro lado, durante esta fase se producen profundos cambios metabólicos. En el caso del tomate, al tratarse de un fruto de tipo carnoso, se producen numerosos cambios fisiológicos que afectan a las características visuales (i.e. color), textura, sabor y aroma, haciendo que el fruto sea más atractivo para el consumidor final (Bartley e Ishida, 2003). Por lo que respecta al color, al inicio de la fase IV el fruto se encuentra en el estadio pintón, momento en el que se aprecia que el fruto ya no es completamente verde sino que empiezan a aparecer tonalidades rojizas (figura 8). A continuación, el fruto exhibe un tono anaranjado y finalmente adquiere el típico color rojo cadmio (figura 9).



Figura 9. Frutos de tomate en estadio verde inmaduro, verde maduro, pintón, rosa y rojo maduro, respectivamente, en vista lateral (arriba) y en sección transversal (abajo). Escala de la barra: 2cm.

Los estudios efectuados hasta la fecha indican que la mayor parte de los genes implicados en el desarrollo y maduración de fruto codifican una amplia gama de productos génicos, entre los que destacan factores de transcripción de la familia MADS-box (Irish, 2003; Jack, 2004). Estos factores de transcripción son capaces de interactuar con otros reguladores así como con señales endógenas (e.g. hormonas) y exógenas (factores ambientales), de forma que el proceso reproductivo tiene lugar de manera coordinada en el espacio y en el tiempo (figura 8B, D).

3.3. Control hormonal del desarrollo de fruto

Las fitohormonas desempeñan un papel relevante en la regulación del desarrollo y la maduración del fruto. Según Ozga y Rienecke (2003), auxinas, citoquininas, giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) y etileno modulan el crecimiento del fruto. Adicionalmente, se ha constatado que otros reguladores del crecimiento como las poliaminas (PAs), ácido salicílico, ácido jasmónico y brasinoesteroides participan en el desarrollo del fruto (Li *et al.*, 1992; Cohen, 1998; Mehta *et al.*, 2002; Vardhini y Rao, 2002; Sheng *et al.*, 2003).

Se ha comprobado que las citoquininas desempeñan un papel clave en la fase en la que se produce una alta tasa de división celular, es decir, en la fase II del desarrollo del fruto. En efecto, la concentración de citoquininas alcanza altos niveles en el fruto a los 5 días de la antesis (figura 8B; Bohner y Bangerth, 1988). Al tratarse de un fruto climatérico, la síntesis autocatalítica de etileno es el principal determinante de la maduración del fruto de tomate (fase IV, figura 8B). Los frutos climactericos como el tomate, la manzana, el plátano y el aguacate se caracterizan por incrementar la respiración y la síntesis de etileno. En este tipo de frutos, el bloqueo de la síntesis o percepción del etileno impide la correcta maduración (Klee y Giovannoni, 2011). Así, muchos de los trabajos de investigación en este campo se han realizado con genes implicados en la regulación dependiente de etileno, principalmente los relacionados con la biosíntesis, percepción y señalización de esta hormona (Cara y Giovannoni, 2008). Por otra parte, el ABA regula la desecación de las semillas e induce el letargo del embrión para evitar la germinación temprana cuando la semilla aún está dentro

del fruto (Gillaspy *et al.*, 1993). La aplicación de diversas poliaminas en el ovario de tomate da lugar a frutos partenocárpicos (Fos *et al.*, 2000). Los brasinoesteroides están implicados en la regulación de la maduración y en la composición del fruto (Srivastava y Handa, 2005). El ácido jasmónico también está implicado en el proceso de maduración, de forma que su concentración aumenta a lo largo del desarrollo del fruto (Imanishi y Nagata, 2004).

Las auxinas y giberelinas desempeñan un papel fundamental a lo largo de diferentes etapas del desarrollo del fruto (Mapelli *et al.*, 1978; Bohner y Bangerth, 1988; Fos *et al.*, 2000; Fos *et al.*, 2001). El análisis de los niveles de auxinas en frutos de tomate en desarrollo han revelado un patrón bimodal en relación con su actividad (ver figura 8B). Los mayores niveles se detectan a los 10 y 30 días después de la anthesis, lo que sugiere que esta hormona desempeña un papel importante en el inicio de la fase de expansión celular (fase III) y en la etapa final del desarrollo del embrión (fase IV) (Abdel-Rahman, 1977; Mapelli *et al.*, 1978; Gillaspy *et al.*, 1993). Por otro lado, las giberelinas producidas por las semillas promueven el desarrollo del fruto (García Martínez *et al.*, 1991). De hecho, los mayores niveles de giberelinas se detectan en las fases II y III que corresponden con etapas de división y expansión celular (Srivastava y Handa, 2005; figura 8B). En todo caso, conviene indicar que la actividad enzimática relacionada con la biosíntesis de giberelinas está regulada por auxinas, siendo éstas últimas necesarias para mantener un nivel adecuado de giberelinas activas (García-Martínez y Hedden, 1997; Ross *et al.*, 2000). Además, estas dos fitohormonas desempeñan un papel fundamental en el cuajado del fruto. En el siguiente apartado, se revisarán los avances que se han conseguido a lo largo de los últimos años y que han permitido ampliar nuestros conocimientos sobre los procesos que acontecen durante el cuajado de fruto dependiente e independiente de polinización.

4. CUAJADO DE FRUTO Y PARTENOCARPIA

En las angiospermas, el cuajado representa la transición desde el ovario a un fruto en desarrollo con capacidad para convertirse en un órgano maduro que garantiza la protección y dispersión de la semilla. El inicio del cuajado depende del éxito de la polinización y fecundación (Gillaspi *et al.*, 1993). La polinización tiene lugar cuando los granos de polen se liberan de los sacos polínicos de la antera y se depositan sobre el estigma de la flor. A continuación se produce la germinación del grano de polen, el crecimiento del tubo polínico a través del tejido estilar y la penetración en el saco embrionario (gametofito femenino). La fecundación implica la unión de una de las células espermáticas del gametofito masculino a la ovocélula para formar el cigoto que dará lugar al embrión, y de la unión de otra célula espermática al núcleo secundario diploide del gametofito femenino para formar un núcleo triploide, a partir del cual se originará el endospermo que servirá como reserva de nutrientes al embrión (Dumas *et al.*, 1998; Farabee, 2001; Raghavan, 2003; Hamamura *et al.*, 2012). Según Fuentes y Vivian-Smith (2009), la fecundación promueve el desarrollo de la semilla, lo que anula la represión de la división celular y desencadena la transición de ovario a fruto de manera sincronizada. En ausencia de polinización y fecundación, el crecimiento del ovario se detiene, la flor experimenta procesos de senescencia y finalmente se desprende de la planta (Medina, 2010), lo que tiene sentido desde un punto de vista adaptativo toda vez que la función biológica del fruto gira en torno a la formación y dispersión de la semilla. Por tanto, el fruto no tiene *a priori* razón de ser sin la formación de semillas.

El cuajado de fruto se atribuye tradicionalmente a la acción de tres fitohormonas: auxinas, giberelinas (GA) y citoquininas (CK) (Mariotti *et al.*, 2011). En frutos normales, los niveles de estas hormonas aumentan tanto en el fruto como en la semilla a lo largo de su desarrollo hasta la maduración (Nitsch, 1950; Blumenfeld y Gazit, 1970; Varga y Bruinsma, 1976; García-Martínez *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2002; Devoghalaere *et al.*, 2012). Se ha propuesto como hipótesis que la semilla se comunica a través de estas hormonas con los tejidos que la envuelven para promover el crecimiento del fruto (Ozga *et al.*, 2002).

Aunque los ovarios de tomate no son capaces de desarrollarse en ausencia de polinización y fecundación, en algunas variedades se desarrollan frutos sin que ocurran estos eventos a través de un proceso denominado partenocarpia (Ho y Hewitt, 1986). De esta forma, se desarrollan frutos que carecen de semilla. Los mecanismos fisiológicos que desencadenan el desarrollo partenocárpico del fruto son hoy por hoy poco conocidos. Sin embargo, se sabe que un desequilibrio hormonal en los niveles de auxinas, giberelinas y citoquininas puede conducir a la partenocarpia (Gorguet *et al.*, 2005). Por ejemplo, tratamientos artificiales de flores de tomate con auxinas o giberelinas exógenas promueven el desarrollo de frutos partenocárpicos. Aunque ambas hormonas son capaces de desencadenar el desarrollo partenocárpico del fruto, parece que actúan por rutas distintas activando mecanismos celulares diferentes. Así, los frutos inducidos por auxinas tienen más células en comparación con los frutos inducidos por giberelinas, cuyas células son de mayor calibre (Bungerkibler y Bangerth, 1983). Con todo, los resultados de diversos investigadores indican que ambas hormonas deben interactuar de manera coordinada para regular el cuajado del fruto (Serrani *et al.*, 2008; Vriezen *et al.*, 2008; Dorsey *et al.*, 2009). Por ejemplo, se ha observado que la aplicación de inhibidores de giberelinas tiene un efecto negativo sobre el desarrollo partenocárpico de frutos de tomate tras un tratamiento con auxinas, lo que indica que la partenocarpia inducida por auxinas depende, al menos en parte, de la activación del metabolismo de GAs (Serrani *et al.*, 2008). Además, se ha comprobado que la polinización induce la acumulación de transcritos de la ruta de señalización de auxinas, pero esto no ocurre en frutos partenocárpicos de tomate tratados con giberelinas (Vriezen *et al.*, 2008), lo que sugiere que las GAs deben actuar corriente abajo de la señalización de auxinas durante los primeros estadios del desarrollo del fruto (de Jong *et al.*, 2009). En este contexto, la caracterización de mutantes partenocárpicos está siendo una herramienta muy útil para avanzar en el conocimiento de las bases moleculares y genéticas que promueven el cuajado del fruto (de Jong *et al.*, 2009a; Carrera *et al.*, 2012; Ruan *et al.*, 2012).

4.1. Implicación de las auxinas en el cuajado

Aunque se sabe desde hace tiempo que las auxinas desencadenan el cuajado del fruto activando la división celular en el pericarpio (Bungerkibler y Bangerth, 1983; Talon *et al.*, 1990; de Jong *et al.*, 2011), aún no está claramente establecido el sitio de acción de las auxinas en el ovario. Pattinson y Catala (2012) analizaron recientemente el flujo de auxinas a lo largo del desarrollo del ovario. Observaron que 6 días antes de la antesis de la flor, las auxinas se acumulaban en los haces vasculares del ovario y en el polo del micrópilo del saco embrionario, 2 días antes de la antesis de la flor se distribuían en los tegumentos del óvulo y en el estadio de antesis se localizaban en las superficies interna y externa del ovario. Los resultados sugieren que las auxinas actúan en tejidos específicos del ovario en función del estadio de desarrollo floral.

En los últimos años se avanzado considerablemente en el conocimiento de los mecanismos moleculares relacionados con la señalización de auxinas. Los genes *IAA*¹, miembros de la familia génica de reguladores transcripcionales *Aux/IAA*, actúan como represores transcripcionales de la ruta de señalización de auxinas (Reed, 2001; Wang *et al.*, 2005). Otros componentes importantes de la ruta de señalización de auxinas son los factores de respuesta a auxinas (ARFs), que controlan de manera específica las respuestas biológicas dependientes de auxinas y promueven el inicio del desarrollo del fruto. Antes de la polinización (en ausencia de auxinas), las proteínas *Aux/IAA* se unen a factores de respuesta a auxinas (ARF por *auxin response factor*), de forma que el heterodímero ARF-*Aux/IAA* reprime la transcripción de genes de respuesta a auxinas (Guilfoyle y Hagen, 2007). Tras la polinización o un tratamiento con auxinas, las proteínas *Aux/IAA* son degradadas por el proteosoma 26S y las proteínas ARF quedan liberadas del efecto represivo de las *Aux/IAA*, permitiendo la activación de genes de respuesta a auxinas (figura 10). Los modelos actuales sugieren que la auxina promueve ubiquitinación de las proteínas *Aux/IAA* a través del complejo SCF (Skp1/Cullin/F-box). En efecto, Wang *et al.* (2005) comprobaron que la reducción de transcritos de *IAA9* genera fenotipos pleiotrópicos caracterizados por el desarrollo de hojas simples en vez

¹ En tomate se han identificado 17 genes *IAA*.

de compuestas o cuajado de fruto en estadios previos a la antesis. Estos fenotipos junto con ensayos de respuesta a aplicaciones de auxina permitieron determinar que la ausencia de expresión de *IAA9* conduce a hipersensibilidad a auxinas, sugiriendo que *IAA9* actúa como un represor transcripcional de la señalización de auxinas.

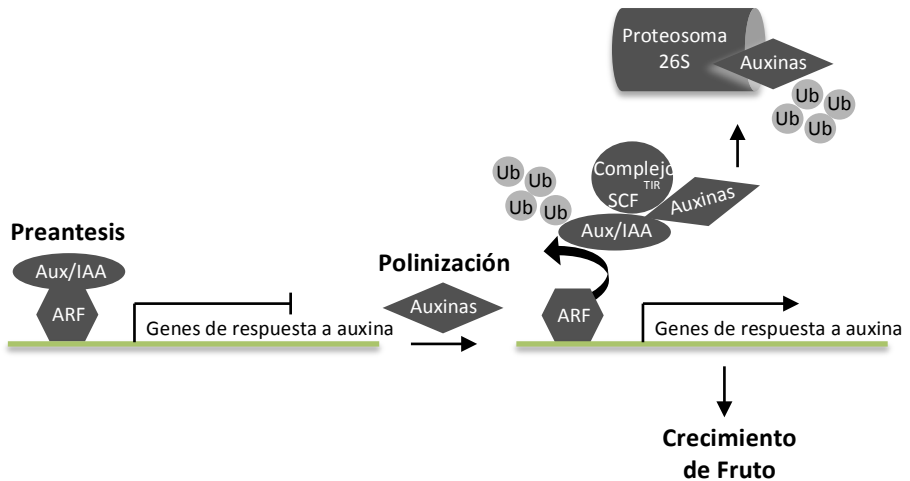


Figura 10. Mecanismo molecular de represión/activación de genes de respuesta a las auxinas (adaptado de Pandolfini *et al.*, 2007). En preantesis, las proteínas Aux/IAA forman heterodímeros con los factores de respuesta a auxinas ARF reprimiendo la transcripción de genes de respuesta a auxinas y, por ende, el crecimiento del ovario. La fecundación de los óvulos conduce a un incremento de la concentración de auxinas. Estas auxinas se unen a las Aux/IAA, e interaccionan con el complejo SCF, de manera que se promueve la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA para su degradación por el proteosoma 26S. De esta forma, las proteínas ARF quedan libres de la represión y activan la expresión de genes de respuesta a auxinas. Ub= ubiquitina.

Uno de los miembros de la familia génica ARF en tomate, en concreto *SIARF7*, el ortólogo de *ARF7* de *Arabidopsis*, actúa como un regulador negativo del cuajado de fruto (de Jong *et al.*, 2009, 2011). Así, se ha visto que los niveles de RNAm de *SIARF7* son elevados en tejido de placenta de flores maduras pero disminuyen rápidamente tras la polinización. También se ha comprobado que el descenso de los niveles de RNAm mediante silenciamiento mediado por RNAi conduce al desarrollo de frutos partenocárpicos en las plantas transgénicas, lo que sugiere que *SIARF7* actúa como un regulador negativo del cuajado del fruto. Se ha observado que los frutos

partenocárpicas de estas plantas transgénicas exhiben características típicas relacionadas con elevados niveles de auxinas y giberelinas, lo que indica que este gen podría estar implicado en la interacción entre estas dos hormonas (de Jones *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos por de Jong *et al.* (2011) corroboran esta hipótesis e indican que *SIARF7* controla las respuestas a auxinas y giberelinas durante el inicio y desarrollo del fruto de tomate.

En *Arabidopsis*, *ARF8/FRUIT WITHOUT FERTILIZATION (FWF)* exhibe el mismo patrón de expresión que *SIARF7* (Goetz *et al.*, 2006). También se ha visto que el alelo mutado *fwf* desencadena la formación de silicuas partenocárpicas (Vivian-Smith *et al.*, 2001). Estas similitudes sugieren que *SIARF7* es el homólogo funcional de *AtARF8/FWF*. Goetz *et al.* (2007) comprobaron que la transferencia del alelo *fwf* a plantas WT inducía la formación de silicuas partenocárpicas, incluso aunque los niveles de *AtARF8* no se vieran reducidos. Los resultados indicarían que las formas aberrantes de *AtARF8* podrían competir con proteínas endógenas de *AtARF8* en la formación de complejos de proteína. También se ha comprobado que la introducción del alelo *fwf* en tomate conduce al cuajado de frutos partenocárpicas, indicando que no sólo *SIARF7* sino también el homólogo de *AtARF8/FWF* en tomate, el gen *SIARF8*, desempeñarían un papel en el cuajado del fruto de tomate (Goetz *et al.*, 2007). Acorde con esta hipótesis, Gorguet *et al.* (2008) identificaron *SIARF8* como un QTL asociado a la partenocarpia. Sin embargo, Serrani *et al.* (2008) observaron que el nivel de expresión de *SIARF8*, en lugar de estar inhibido o reducido, era mayor tras un tratamiento con auxinas, lo que sugiere que si este gen tiene alguna función en el cuajado del fruto de tomate debe de actuar de diferente manera que *SIARF7* o *AtARF8*. En consecuencia lo que podría ocurrir es que la introducción del alelo *fwf*, es decir, de formas aberrantes de *AtARF8*, interfiriera no con *SIARF8* sino con *SIARF7* en la formación de complejos de proteína, lo que explicaría el desarrollo de frutos partenocárpicas en las plantas transgénicas.

En *Arabidopsis*, la familia de proteínas de unión a auxinas F-box (ABF por *auxin-binding f-box protein*) y *TIR1 (transport inhibitor response protein 1)* tienen funciones duales, como receptores de auxinas y como subunidades F-box del complejo ubiquitina-ligasa (E3) que reconocen proteínas Aux/IAA y las localizan para su

degradación a través de la ruta del proteosoma 26S (Mockaitis y Estelle, 2008). El supuesto ortólogo de *TIR1* en tomate (*SITIR1*) también parece estar involucrado en la ruta de señalización de auxinas. Así, las plantas que sobreexpresan *SITIR1* desarrollan hojas con un menor grado de complejidad y frutos partenocárpico, lo que sugiere que *SITIR1* podría ser un regulador positivo de la señalización de auxinas (Ren *et al.*, 2011).

La identificación de genes asociados a la señalización de auxinas ha permitido clarificar el mecanismo a través del cual se induce partenocarpia en el fruto de tomate. Por ejemplo, en el caso de *SIIAA9*, comentado anteriormente, antes de la polinización y en ausencia de inducción por auxinas, la proteína IAA9 se une a una proteína ARF formando un complejo heterodimérico que inhibe la ruta de señalización de auxinas corriente abajo. Tras la polinización, el receptor *SITIR1* percibe un aumento de auxinas en el ovario y el complejo ubiquitina-ligasa SCF^{SITIR1} cataliza la poliubiquitinación de *SIIAA9* promoviendo su degradación a través de la ruta del proteosoma 26S. De esta forma, los factores ARF libres se unen a las regiones promotoras de genes de respuesta a auxina (de Jong *et al.*, 2009).

El gen *AUCSIA* (*auxin cum silencing action*) se identificó mediante el análisis comparativo de la expresión génica en botones florales de líneas de tomate que expresaban la construcción *DefH9-iaaM*² y de líneas WT (Molesini *et al.*, 2009). En tomate se han identificado dos genes *AUCSIA* (*AUCSIA1*, *AUCSIA2*) que codifican pequeños polipéptidos de 53 aminoácidos. Los resultados obtenidos hasta la fecha sugieren que estos dos genes deben ser reguladores negativos del cuajado del fruto ya que sus transcritos y proteínas disminuyen tras la polinización o en plantas transgénicas que desarrollan frutos partenocárpico. Además, el silenciamiento vía RNAi de *AUCSIA* promueve un aumento del nivel de IAA en las flores transgénicas (100 veces respecto a las flores WT) y conduce a la partenocarpia del fruto. Sin embargo, esta partenocarpia no se puede correlacionar con una disminución de los transcritos de *IAA9* y *ARF8*. Por ello, se ha sugerido que la proteína *AUCSIA*, al estar formada por un motivo Tyr implicado en endocitosis, podría desempeñar un papel importante en el transporte de auxina.

² Las plantas transgénicas *DefH9-iaaM* desarrollan frutos partenocárpico.

DIAGEOTROPICA (DGT) fue uno de los primeros componentes descritos de la ruta de señalización de las auxinas relacionado con el cuajado de fruto en tomate. Los mutantes *dgt* de tomate se caracterizan por exhibir una reducida sensibilidad a auxinas (Kelly y Bradford, 1986; Mito y Bennett, 1995) y tener alterados procesos relacionados con el cuajado de fruto, tamaño de fruto y número de semillas y lóculos por fruto (Balbi y Lomax, 2003). Lo que se piensa es que la reducida tasa de cuajado de fruto en estos mutantes podría estar relacionada con la menor respuesta a auxinas en el ovario. Aunque se sabe que el gen *DGT* codifica una ciclofilina, un peptidil-propilisomerasa que cataliza la isomerización desde el estado *trans* al *cis* de residuos de prolina en péptidos, aún se desconoce el papel que desempeña en la transducción de señal de auxinas (Oh *et al.*, 2006). Lo que sí se sabe es que la mutación del gen *dgt* afecta a diferentes subgrupos de genes de respuesta a auxina tipo Aux/IAA.

Se ha comprobado que el silenciamiento de la *chalcona sintasa (CHS)*, un gen que actúa en la primera etapa de la ruta biosintética de los flavonoides, estimula el cuajado del fruto en ausencia de polinización. En efecto, Schijlen *et al.* (2007) observaron que las plantas transgénicas que tenían silenciados los genes homólogos *CHS1* y *CHS2* reducían drásticamente los niveles de flavonoides y producían frutos partenocárpicos. Teniendo en cuenta que estas fitohormonas afectan a la respuesta a auxinas (Brown *et al.*, 2001; Wasson *et al.*, 2006), se ha sugerido que el silenciamiento de los genes *CHS* podría promover un aumento de la respuesta a auxinas.

4.2. Implicación de las giberelinas en el cuajado

Las giberelinas (GA) intervienen en diversos aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la elongación del tallo, la germinación de la semilla, la transición floral y la fertilidad (Finkelstein *et al.*, 2008; Sun y Gubler, 2004). Los análisis genéticos y moleculares han demostrado la importancia de las GAs en el desarrollo vegetativo y el cuajado de fruto. Los mutantes de tomate *gib1*, *gib2* y *gib3*, afectados en la biosíntesis de GAs, exhiben enanismo y alteraciones en el cuajado y desarrollo del fruto, pero la

aplicación exógena de GAs rescata el fenotipo silvestre, lo que demuestra el papel esencial de las GAs en el desarrollo de la planta y el cuajado (Bensen y Zeevaart, 1990).

La biosíntesis de GAs se produce a través de diferentes pasos catalizados por enzimas que tienen una localización subcelular distinta. A pesar de su complejidad, la ruta se puede dividir en tres fases (figura 11): i) la biosíntesis de *ent*-kaureno en los proplastidios a partir de geranyl geranyl pirofosfato (GGPP), ii) la conversión de *ent*-kaureno a GA₁₂ en el retículo endoplasmático y iii) la síntesis de GAs activas en el citoplasma a partir de GA₁₂ (Hedden y Phillips, 2000; Olszewski *et al.*, 2002). Se han identificado numerosas GAs en plantas superiores, hongos y bacterias, pero sólo unas pocas son biológicamente activas (GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇). Las demás son mayoritariamente intermediarios de la ruta o productos del catabolismo.

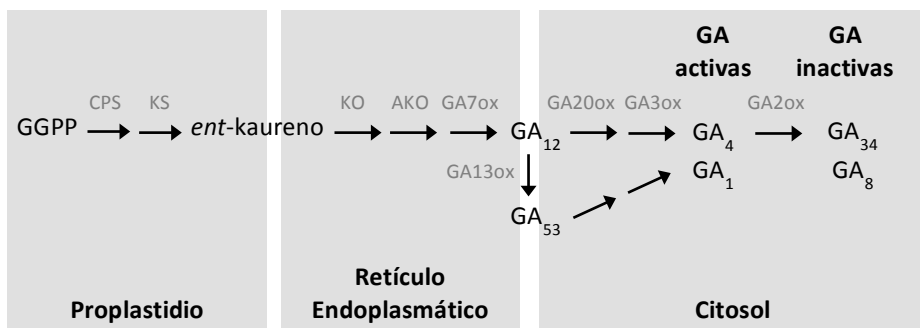


Figura 11. Metabolismo de las giberelinas (GAs) y su compartimentación subcelular. El *ent*-kaureno se sintetiza mediante enzimas solubles localizadas en el proplastidio. Posteriormente se convierte a través de enzimas asociadas al retículo endoplasmático a GA₁₂. La oxidación de GA₁₂ mediante enzimas solubles de localización citoplasmática da lugar a la formación de GAs activas e inactivas.

AKO= ácido *ent*-kaurenóico sintasa; CPP= copalil pirofosfato; CPS= *ent*-copalil bifosfato sintasa; GA3ox: GA 3β-hidroxilasa; GA(n)ox= GA(n)-oxidasa; GGPP= geranylgeranyl pirofosfato; KO= *ent*-kaureno; KS= *ent*-kaureno sintasa.

La siguiente etapa de la ruta de biosíntesis consiste en oxidaciones sucesivas catalizadas por las dioxigenasas (dependientes de 2-oxoglutarato) GA20 oxidasas (GA20ox) y GA3 oxidasas (GA3ox), que darán lugar a GA₁ y GA₄. Finalmente, las GA2 oxidasas (GA2ox) catalizan la 2β-hidroxilación que convierte a estas GAs en las formas inactivas GA₈ y GA₃₄ respectivamente (figura 11). El balance de GAs bioactivas e

inactivas está regulado por mecanismos de retroalimentación negativa y positiva, es decir, la expresión de las enzimas GA20ox y GA3ox está regulada negativamente por GAs, mientras que la expresión de las GA2ox está inducida por GAs (Hedden y Phillips, 2000; Olszewski *et al.*, 2002).

En tomate, la aplicación de las GA bioactivas (GA₁ y GA₄) en ovarios emasculados ha permitido descubrir que GA₁ es un inductor más eficaz del cuajado de fruto que GA₄, en tanto que ésta última parece más determinante durante la germinación de la semilla (Nakaune *et al.*, 2012; Serrani *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta esto, en tomate se podrían utilizar diferentes GAs bioactivas para diferentes propósitos, o bien la función de las GAs bioactivas podría variar en función del órgano o del proceso de desarrollo. En ovarios polinizados se produce la acumulación de transcritos de *GA20 oxidasa* (GA20ox), mientras que en ovarios no polinizados esta mayor acumulación no ocurre (Serrani *et al.*, 2007). Por el contrario, los transcritos correspondientes a enzimas de la ruta catalítica de GAs no difieren de manera significativa entre ovarios polinizados y no polinizados. Estos resultados sugieren que la biosíntesis de GA₁ en el ovario podría ser un regulador clave de la transición al cuajado y que GA20ox sería el factor limitante en el control de la biosíntesis de GA₁.

La cascada de señales que se desencadenan tras la percepción de GAs se conoce menos que su biosíntesis, aunque sistemas como la aleurona de los cereales y los mutantes de respuesta a GAs de *Arabidopsis* y arroz han permitido avanzar en el conocimiento del proceso de señalización de esta hormona (Olszewski *et al.*, 2002). La señalización por GAs se basa en la degradación de proteínas. El descubrimiento de la función de las proteínas DELLA en la señalización de GAs ha permitido comprobar que el mecanismo de acción es similar al de otras vías de señalización, tanto de hormonas (auxinas, etileno o jasmonato) como de otros estímulos (i.e. la luz). Las proteínas DELLA actúan como reguladores negativos de la respuesta a GAs y su degradación se lleva a cabo a través de la ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma 26S (Sun y Gubler 2004). En este proceso cobra especial relevancia el complejo enzimático SCF (Skp1/cullin/F-box) ubiquitina-ligasa (E3) cuya subunidad F-box posee un dominio C-terminal que confiere la especificidad de unión al sustrato que se debe ubiquitinar

(Thomas y Sun, 2004). En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 5 miembros de la familia DELLA que poseen funciones parcialmente solapadas, mientras que en tomate sólo se conoce un gen: *DELLA* (*PROCERA/SIDELLA*) (Bassel *et al.*, 2004, 2008). El silenciamiento de *PROCERA/SIDELLA* promueve efectos pleiotrópicos en las plantas transgénicas, lo que incluye mayor elongación del tallo, elongación del estilo, así como el desarrollo de frutos partenocárpicos que exhiben características similares a los que se obtienen mediante tratamientos con giberelinas (Marti *et al.*, 2007). Esto quiere decir que menores niveles de expresión de *SIDELLA* permitirían activar la ruta de señalización de giberelinas tal y como ocurre después de la polinización y fecundación del ovario. Así, *SIDELLA* actuaría como un regulador negativo del cuajado de fruto en tomate al restringir la señal de giberelinas y prevenir el crecimiento del ovario antes de que se produzca la polinización y fecundación. Los frutos partenocárpicos de las plantas que tienen silenciado el gen *PROCERA/SIDELLA* son más pequeños, con células alargadas y con menor número de células en el pericarpio. Estos resultados podrían estar indicando que las células de los frutos de estas plantas sólo han experimentado elongación celular pero no división celular regulada por auxinas. Acorde con lo anterior, la aplicación exógena de giberelinas induce partenocarpia sin alterar la expresión de genes implicados en la señalización de auxinas. Además, la aplicación de inhibidores de giberelinas tiene un efecto negativo sobre el desarrollo partenocárpico de frutos de tomate tras un tratamiento con auxinas. En definitiva, los resultados obtenidos hasta la fecha enfatizan la importancia de la ruta de señalización de GAs sobre el cuajado del fruto (Serrani *et al.*, 2008; Vriezen *et al.*, 2008).

4.3. Implicación de las citoquininas en el cuajado

Al igual que ocurre con las concentraciones de auxina y giberelina, los niveles de citoquinina (CK) aumentan en el ovario tras la polinización (Matsuo *et al.*, 2012). Aunque se considera generalmente que las citoquininas juegan un papel crítico estimulando la división celular durante el desarrollo (Wismer *et al.*, 1995; Srivastava y Handa, 2005), existen muy pocos datos acerca de su función en la fase inicial de división celular del fruto (Mariotti *et al.*, 2011). Las citoquininas promueven la

proliferación celular en los meristemas apicales de ápice e interactúan de manera coordinada con las auxinas (Murray *et al.*, 2012). No se puede descartar que operen de manera similar en el gineceo en desarrollo (Lindsay *et al.*, 2006; Bartrina *et al.*, 2011). Estudios en *Arabidopsis* han demostrado que las citoquininas tienen al menos dos funciones durante el desarrollo del fruto: i) inducir la proliferación celular temprana en la región media del gineceo en desarrollo y ii) promover la formación de los márgenes de las valvas de la silicua (Marsch-Martinez *et al.*, 2012).

Bohner *et al.* (1988) observaron que la concentración de citoquinina aumenta cinco días después de la antesis, cuando la división celular es más activa, lo que sugiere que debe existir una correlación positiva entre las citoquininas y la división celular. De hecho, Bohner y Bangerth (1988) sugirieron que las citoquininas eran secretadas por las semillas en desarrollo para activar la división celular en los tejidos a su alrededor. Más recientemente, Matsuo *et al.* (2012) demostraron que la aplicación de CKs sintéticas sobre ovarios en estadio de preantesis activaba la división celular y conducía a la formación de frutos partenocárpicos. Los resultados que se han obtenido hasta la fecha indican que las citoquininas actúan como reguladores positivos del crecimiento del fruto.

4.4. Implicación del etileno en el cuajado

El etileno es la más simple de las hormonas vegetales, con sólo dos carbonos y cuatro hidrógenos. Esta hormona es percibida por receptores tipo histidina-kinasa que regulan negativamente la respuesta a etileno. Se ha observado que la sobreexpresión del gen de tomate *SITPR1* (*tetratricopeptide repeat protein 1*), que interactúa con los receptores de etileno NR y LeETR1, activa un subconjunto de respuestas a etileno y auxinas, dando lugar a la producción de frutos partenocárpicos (Lin *et al.*, 2008). Las líneas que sobreexpresan *SITPR1* parecen exhibir un fenotipo de deficiencia en GAs, lo que incluye enanismo, longitud intermodal reducida y menor grado de complejidad de las hojas. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *SITPR1* incrementa la respuesta a auxinas y reduce la de GAs, acorde con los resultados obtenidos en

Arabidopsis que indican que una mayor señalización por etileno modula los niveles de auxinas y giberelinas (Achard *et al.*, 2007). Por otro lado, los transcritos de *SIIAA9* se ven considerablemente reducidos en las líneas de sobre-expresión de *SITPR1*, lo que indica que la partenocarpia se debe a una regulación negativa de *SIIAA9*.

En ovarios de tomate, la expresión de diferentes genes relacionados con etileno parece estar alterada en el inicio de la transición a fruto (Pascual *et al.*, 2009, Vriezen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Así, el etileno podría regular el crecimiento del ovario regulando la transcripción de genes relacionados con auxinas, como es el caso de *SIIAA9*. Conviene indicar que la regulación negativa de *SIIAA9* desencadena partenocarpia, tal y como se ha descrito anteriormente, y va acompañada de numerosos cambios en la expresión de los genes relacionados con etileno. Según Wang *et al.* (2009), la partenocarpia vincularía la activación de las rutas de señalización de auxinas y también de etileno.

Estudios recientes indican que el etileno también desempeña un papel en el proceso de cuajado de fruto sobre la base de la supresión del mecanismo de las giberelinas (Shinozaki *et al.*, 2015). En efecto, los frutos partenocárpicos que desarrollan los mutantes *Sletr1-1*, insensibles al etileno, tienen células de mayor tamaño que el WT, experimentan un incremento en los niveles de transcrito de *SIGA20ox3* y contienen elevadas concentraciones de GAs bioactivas. En conjunto, los resultados indican que el etileno cumple una cierta función en el proceso de cuajado de fruto.

4.5. Implicación del ácido abscísico en el cuajado

El ácido abscísico (ABA) se ha vinculado tradicionalmente a la respuesta de la planta frente a un estrés ambiental (i.e. frío o sequía) a través del control de la apertura estomática (Comstock, 2002). Así, una disminución en la síntesis de ABA, un aumento del catabolismo de ABA o una menor sensibilidad a ABA conduce a alteraciones en el cierre de los estomas.

Los mutantes de tomate *notabilis* (*not*) y *flacca* (*flc*) son deficientes en ABA (Tal, 1966; Tay y Nevo, 1973). *not* tiene una mutación en las pautas de lectura del gen *LeNCED1*, que cataliza la primera etapa en la biosíntesis de ABA, lo que se traduce en menores niveles de ABA (en torno a la mitad) respecto al WT. Por su parte, el mutante *flc* tiene alterado el enzima aldeído oxidasa, que cataliza la etapa final de la biosíntesis de ABA, lo que provoca una reducción del 80% de los niveles de ABA respecto al WT (Herde *et al.*, 1999). Nitsch *et al.* (2012) caracterizaron estos dos mutantes así como el doble mutante *not flc*, cuyos niveles de ABA son menores que los niveles de los dos mutantes simples, y observaron la existencia de correlaciones positivas entre los niveles de ABA y el peso del fruto. Por lo que parece, el menor calibre del fruto de los mutantes no está relacionado con una reducción del número de células, sino más bien con una menor expansión celular en el pericarpio. Teniendo en cuenta que los niveles de auxinas en estos mutantes no se encuentran alterados, los autores postulan que el ABA podría regular de forma positiva la expansión celular en el fruto. Además, los autores observaron que los frutos del doble mutante *not flc* eran más pequeños que los de los mutantes simples y producían más etileno durante el desarrollo. Estos resultados sugieren que el ABA promueve tanto la expansión celular en el pericarpio como la reducción de la producción de etileno.

Actualmente se sabe más bien poco sobre las interacciones del ABA con otras hormonas a lo largo del desarrollo del fruto. Con todo, se ha comprobado mediante análisis transcriptómico que la expresión de genes de biosíntesis de ABA es elevada antes de la polinización, mientras que después se observa la inducción de genes de la ruta catabólica del ABA. Estos resultados parecen indicar que el ABA mantiene el estado latente de los ovarios y reprime la transición a fruto antes de la polinización, actuando adicionalmente como un antagonista de las GAs y de las auxinas (Pascual *et al.*, 2009).

4.6. Mutantes partenocárpicos y genes homeóticos florales

Las investigaciones realizadas a lo largo de los últimos años en torno al papel que desempeñan las hormonas en el inicio del desarrollo del fruto nos han permitido tener un conocimiento aceptable sobre diferentes componentes que inducen partenocarpia. Sin embargo, seguimos sin tener claro la naturaleza molecular de los *loci* *PAT* y cómo promueven el desarrollo precoz del fruto (Mazzucato *et al.*, 1998). La identificación de estos *loci* sería de enorme utilidad a la hora de avanzar en el conocimiento de la base genética del cuajado partenocárpico del fruto.

El fenotipo del mutante *pat*, que se detectó en los cultivares *Soressi* y *Montfavet 191*, se caracteriza por el desarrollo de flores anormales, prematuro crecimiento del ovario, reducido número de óvulos viables, mayor número de capas celulares en el pericarpio, estambres pequeños transformados en órganos carpeloides y menor tamaño de fruto (Soressi y Salamini, 1975; Mazzucato *et al.*, 1998). Aunque aún no se ha clonado el gen *pat*, se sabe que está situado en el brazo largo del cromosoma 3 (Beraldi *et al.*, 2004).

El mutante *pat2* se detectó en el cultivar *Severianin*. Los estudios genéticos determinaron que *pat* y *pat2* no son alélicos (Philouze y Maisonneuve, 1978; Nuez *et al.*, 1986). La introgresión del locus *pat2* en diferentes variedades permitió descubrir que el fenotipo de partenocarpia era dependiente del fondo genético. Se ha propuesto que *sp* (*self pruning*), una mutación que afecta al hábito de crecimiento, podría amplificar la actividad de *pat2*, mientras *ls* (*lateral suppressor*), una mutación que afecta al desarrollo de brotes laterales, reprimiría la formación de frutos partenocárpicos (Gorguet *et al.*, 2005). Según Vardy *et al.* (1989), el locus *pat2* podría incluir dos genes recesivos cuyas mutaciones afectan a su actividad funcional.

El mutante *pat3/pat4* se detectó en el cultivar *RP75/59*. Los estudios genéticos parecen indicar que *pat2* y *pat3/pat4* tampoco son alélicos (Nuez *et al.*, 1986). El control genético de este locus parece que es más complejo que el de los anteriores. Así, se ha estimado que el locus podría estar compuesto por 2 a 5 genes, ninguno de los cuales ha sido aún identificado.

Se ha comprobado que en los ovarios no polinizados de los mutantes *pat* y *pat2* se acumulan elevadas concentraciones de GA₂₀ (Fos *et al.*, 2000; Olimpieri *et al.*, 2007). Jong *et al.* (2009) afirman que no se puede descartar que sea esta acumulación la responsable de la partenocarpia de los frutos. Acorde con esta hipótesis, Olimpieri *et al.* (2007) habían observado previamente que el mutante *pat* exhibía elevados niveles de expresión de *SIGA20ox1* en diferentes estadios del desarrollo del ovario y del fruto. Por otro lado, en los frutos de plantas de fenotipo silvestre se sabe que el nivel de expresión de *SPINDLY* (*SPY*), un regulador negativo de la respuesta a giberelinas, aumenta en el estadio de antesis y disminuye tras la polinización. Olimpieri *et al.* (2007) observaron que en el mutante *pat* no se producía el incremento de expresión de *SPY* en el estadio de antesis. Estos mismos autores también comprobaron en ovarios de plantas WT que el nivel de expresión de los genes *KNOX*, represores de la expresión de genes *GA20oxs* (Hay *et al.*, 2002), aumentaba en antesis pero disminuía tras la polinización; sin embargo, en *pat* la reducción de la expresión se producía antes de que se alcanzara el estadio de antesis. El fenotipo de partenocarpia de *pat3/pat4* también parece que depende de los niveles de giberelinas, pero a diferencia de lo que ocurre en los mutante *pat* y *pat2*, en *pat3/pat4* la ruta completa de la 13 hidroxilación está sobre-expresada, lo que hace que las concentraciones de GA₁ y GA₃ en estadios previos a la polinización sean muy elevadas (Fos *et al.*, 2001). Estos resultados parecen indicar que los productos génicos de *pat1*, *pat2* y *pat3/pat4* interactúan con genes que intervienen en diferentes etapas de la ruta de biosíntesis de GAs.

Los loci *pat* afectan a la morfología floral y la esterilidad a través conversiones homeóticas. En efecto, en los mutantes *pat* es característico el desarrollo de estructuras de tipo carpeloide en las anteras. Teniendo en cuenta las similitudes que comparten los fenotipos *pat* con los observados en las plantas que exhiben menor nivel de expresión de los genes MADS-box *TM5* y *TM29*, se ha sugerido que *pat* podría ser algún gen que desempeñan funciones homeóticas (Mazzucato *et al.*, 1998, 2008; Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002). En cualquier caso, aún no se sabe si la partenocarpia está directamente regulada por proteínas TM o si se debe a cambios de tipo hormonal relacionados con el desarrollo anormal de los órganos reproductivos.

Lozano *et al.* (1998) comprobaron que niveles permanentes de expresión del gen *TM4* (*TDR4*), un gen de tomate homólogo a *FUL*, incrementan notablemente el crecimiento de frutos partenocárpicos en condiciones de bajas temperaturas. Asimismo, se ha observado en flores tratadas con GAs una acumulación de transcritos de *SIDEF/STAMENLESS*, un gen MADS-box de clase B de tomate requerido para el desarrollo de pétalos y estambres. Estos resultados parecen indicar que los cambios en los niveles de expresión de genes MADS-box mediados por las giberelinas podrían ser el origen de la partenocarpia en tomate, ya sea regulando el desarrollo de los órganos reproductivos (estambres o carpelos) o a través de cambios en la señalización o biosíntesis de los GAs. Adicionalmente, las interacciones de estos genes con *PAT* podrían regular el desarrollo sincrónico del polen y del ovario, y por tanto la formación del fruto.

Mazzucato *et al.* (2008) observaron que el nivel de expresión de *SIDEF* en los ovarios de flores WT en antesis era muy elevado, pero esto no ocurría en el mutante *pat*. Vivian-Smith *et al.* (2001) habían propuesto previamente que los estambres podrían desempeñar un papel en la regulación del cuarto verticilo floral reprimiendo el crecimiento del ovario hasta que se produjera la polinización. Acorde que esta hipótesis, se ha observado que la mutación de un gen MADS-box de clase B en manzano (*Malus domestica* Borkh) desencadena el desarrollo de frutos partenocárpicos (Yao *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha reportado que la anulación de la función B en plantas transgénicas conduce ocasionalmente al desarrollo de frutos partenocárpicos (Gómez *et al.*, 1999; de Martino *et al.*, 2006). Sobre la base de todos estos resultados, Mazzucato *et al.* (2008) proponen un modelo en el que *SIDEF*, junto con los genes *KNOX* y miembros de las familias *Aux/IAA* y *ARF*, actuaría como otro de los represores del desarrollo del ovario evitando su crecimiento en ausencia de polinización. La polinización, así como mutaciones que podrían localizarse corriente arriba (e.g. *pat*), desestabilizarían el sistema represivo permitiendo que se inicie el desarrollo del fruto.

También se ha reportado que para que se produzca el cuajado de fruto en tomate a través de un proceso dependiente de polinización es necesario que disminuyan los

niveles de expresión de *TAG1* y *TAGL6* (Wang *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha comprobado que *TAG1* se expresa hasta la fase II del desarrollo del fruto (Busi *et al.*, 2003), lo que sugiere que el producto génico resultante de la expresión de este gen debe de cumplir alguna función en los primeros estadios de crecimiento del fruto. En definitiva, los resultados que se han obtenido hasta la fecha parecen indicar que algunos factores de transcripción MADS-box implicados en procesos relacionados con el desarrollo de la flor y del fruto intervienen en el cuajado del fruto en tomate. Con todo, no se puede descartar que otros genes MADS-box desempeñen funciones más o menos relevantes en este proceso.

4.7. Integración de los diferentes componentes implicados en el cuajado de fruto

Ariizumi *et al.* (2013) han propuesto un modelo que integra los diferentes componentes que podrían estar implicados en el cuajado de frutos partenocárpicos (figura 12). Auxinas, giberelinas y citoquininas desempeñan un papel clave en este proceso ya que sus niveles aumentan tras la polinización, activan las rutas de respuesta y promueven el crecimiento del fruto a través de los procesos de división y expansión celular. En ausencia de polinización y fecundación, la aplicación exógena de estas tres hormonas permite obtener desarrollo partenocárpico del fruto.

La ruta de señalización de auxinas arbitra las respuestas a auxina promoviendo interacciones proteicas con varios factores clave. *SITR1* parece ser un regulador positivo de la señalización de auxinas, desactivando el represor de la respuesta a auxina *S/IAA9* (Ren *et al.*, 2011). Por el contrario, *AUCSIA* y *SIARF7* actúan como reguladores negativos de la respuesta a auxinas. De hecho, algunos de los genes de respuesta a auxina pueden activar genes *Aux/IAA* para crear una retroalimentación negativa que ajuste la intensidad de la respuesta a auxina (de Jong *et al.*, 2009). *SICHS* también podría ejercer represión sobre la respuesta a auxinas (Wasson *et al.* 2006).

Se sabe que la ruta de respuesta a giberelinas está estrechamente relacionada con la ruta de respuesta a auxinas. De hecho, se ha demostrado que la auxina induce el

cuajado de fruto incrementando la biosíntesis de giberelinas y parece que actúa corriente arriba de las GAs (Serrani *et al.*, 2008; Vriezen *et al.*, 2008). Conviene indicar que la ruta de señalización de las giberelinas también está sujeta a una retroalimentación positiva. En este sentido, las giberelinas estimulan la degradación de las proteínas DELLA, que son represores de la señalización de las giberelinas (Bassel *et al.*, 2008). Conviene también recordar que los mutantes *pat* tienen alterada la ruta de señalización de las GAs, aunque aún se desconocen los mecanismos moleculares que conducen a la formación de frutos partenocárpico en estos mutantes.

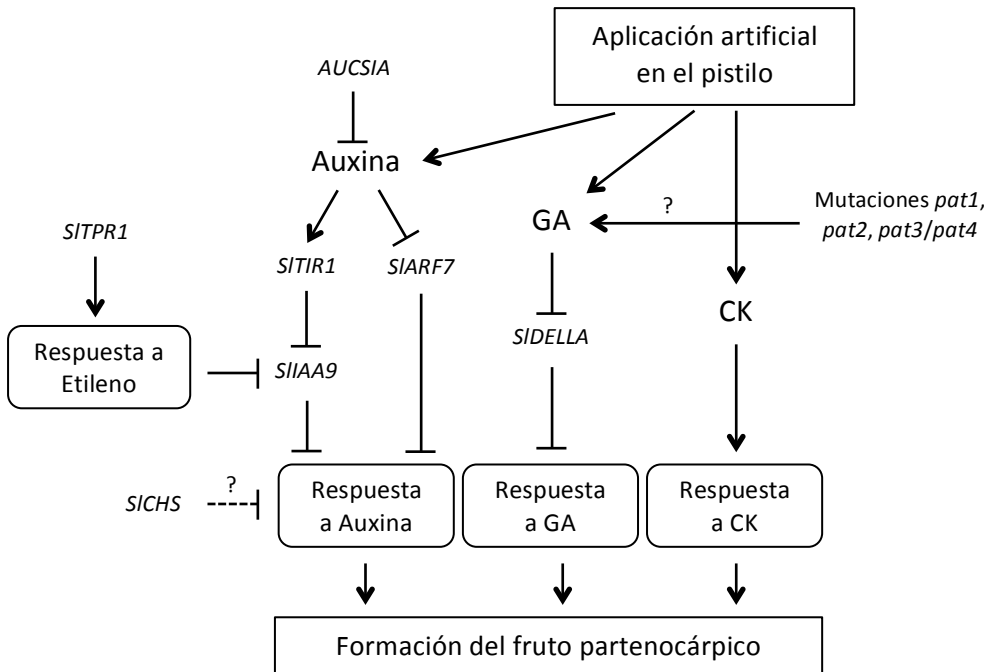


Figura 12. Modelo sobre la regulación del desarrollo del fruto partenocárpico a través de las rutas de señalización hormonal (adaptado de Ariizumi *et al.*, 2013). La partenocarpia se debe a la acción de diversos componentes implicados en las rutas de señalización de varias hormonas, en particular etileno, auxinas, giberelinas (GA) y citoquininas (CK). *SITPR1* y *SITIR1* podrían actuar como reguladores positivos del cuajado de fruto, mientras que *AUCSIA*, *SIARF7*, *SIIAA9*, *SIDELLA* y *SICH5* lo harían como reguladores negativos. Tres mutaciones *pat*: *pat1*, *pat2* y *pat3/pat4* podrían estar asociadas con la síntesis o la señalización de giberelinas.

AUCSIA= auxin cum silencing action; *SIARF*= *Solanum lycopersicum* auxin response factor; *SICH5*= *Solanum lycopersicum* chalcine synthase; *SIDELLA*= *Solanum lycopersicum* DELLA; *SITIR1*= *Solanum lycopersicum* transport inhibito response protein 1 ; *SITPR1*= *Solanum lycopersicum* tetratricopeptide repeat protein 1.

INTRODUCCIÓN CUAJADO Y PARTENOCARPIA

Citoquininas, etileno y ácido abscísico también parece que desempeñan un papel importante en el cuajado del fruto, interactuando con auxinas y giberelinas. Las citoquininas son reguladores positivos del crecimiento del fruto y podrían mediar en la ruta de las giberelinas (Sun *et al.*, 2004). El etileno también podría regular el crecimiento del ovario modulando la transcripción de genes relacionados con auxinas, como *SIIAA9* (Vriezen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), o interviniendo en la biosíntesis de giberelinas (Shinozaki *et al.*, 2015). El ácido abscísico también contribuiría en esta red de regulación manteniendo el estado latente de los ovarios y actuando como un antagonista de las GAs y de las auxinas (Pascual *et al.*, 2009).

5. MUTAGÉNESIS INSERCIONAL Y MEJORA

5.1. Genómica funcional y genética del desarrollo

En las últimas dos décadas se han conseguido notables avances en el campo de la genética del desarrollo del tomate. La clonación y análisis funcional de genes de tomate ortólogos a los de otras especies modelo (e.g.: *Arabidopsis*, *Anthirrinum*, *Petunia*) ha revelado que muchos procesos del desarrollo están controlados por genes y proteínas altamente conservados entre especies.

Sin embargo, las características específicas del tomate parecen requerir nuevas funciones génicas. El tomate posee un genoma de tamaño moderado (950 Mb) (Arumuganathan y Earle, 1991) que contiene unos 35.000 genes aproximadamente (Van der Hoeven *et al.*, 2002). La mayoría de estos genes se sitúan en tramos contiguos de eucromatina que representa menos del 25% (220 Mb) de la totalidad del ADN (Peterson *et al.*, 1998). Al parecer, el 30% de estos genes no tiene correspondencia funcional con los de *Arabidopsis*, es decir, la función de la mayoría de estos genes sigue siendo desconocida (Van der Hoeven *et al.*, 2002). De hecho, hoy por hoy, tres años después de la secuenciación del primer genoma de tomate (cultivar Heinz 1706), se ha descubierto que zonas específicas del genoma se encuentran carentes de variación genética, debido a los sucesivos procesos de domesticación y mejora. Este fenómeno ocurre, por ejemplo, en genes que regulan el tamaño de fruto o que promueven resistencia a enfermedades (Lin *et al.*, 2014).

Caracteres como la arquitectura de planta, precocidad, androesterilidad, partenocarpia o maduración y conservación post-cosecha del fruto tienen una gran importancia agronómica y dependen del establecimiento de patrones de desarrollo adecuados que, a su vez, están finamente regulados por distintos genes capaces de responder a señales endógenas y otras de naturaleza ambiental. Por esta razón, la identificación y caracterización funcional de nuevos genes implicados en estos procesos del desarrollo suscita un enorme interés, tanto desde un punto de vista científico como aplicado, ya que se podrían establecer las bases para la mejora específica de caracteres de relevancia comercial en esta especie.

5.2. Los mutantes como herramienta de genómica funcional

La detección y análisis de mutantes es una de las aproximaciones más exitosas para llevar a cabo la disección genética de caracteres de interés agronómico. En efecto, la identificación de mutantes ha sido un factor determinante en la aparición de nuevos cultivares, lo que tiene una gran trascendencia práctica. En el caso del tomate, y por citar solo algunos ejemplos, el cambio en el hábito de crecimiento (indeterminado a determinado) y el desarrollo de cultivares adaptados a la recolección mecánica, con frutos de larga vida o mayor contenido en licopeno ha sido factible gracias a la detección de mutantes como *self-pruning*, *jointless*, *rin* y *alcobaca*, *high-pigment 1* y *2*, respectivamente.

Al mismo tiempo, la identificación y análisis de mutantes permitió en su día iniciar la disección genética de procesos tan complejos como los que explican la determinación de un órgano (e.g. mutantes homeóticos) o la especificación de los verticilos de una flor (e.g. modelo ABC y derivaciones del mismo, Coen y Meyerowitz, 1991; Pelaz *et al.* 2000; Malcomber y Kellogg, 2005), proporcionó un panorama coherente sobre los genes y procesos implicados en la maduración de frutos carnosos (Giovannoni, 2007), e incluso ha sido clave para el descubrimiento de nuevas hormonas vegetales (Gómez-Roldan *et al.* 2008; Umehara *et al.* 2008). La ventaja de una aproximación basada en el análisis de mutantes estriba en que permite identificar los genes clave que intervienen en un proceso complejo, ya que la identificación de los mismos no depende de su nivel de expresión, sino del efecto fenotípico que produce su alteración. Por ejemplo, la variación en ciertos genes es capaz de generar un cambio en la forma, tamaño o color del fruto de tomate, pese a tratarse de caracteres en los que intervienen otros muchos genes. Lo que importa, pues, no es describir los cientos o miles de genes que se expresan o reprimen en un proceso, sino aquellos otros cuya simple variación determina un cambio cualitativo en el carácter en cuestión. En definitiva, la identificación y caracterización fenotípica exhaustiva de un mutante aporta una información valiosa sobre la función del gen mutado y puede ser el paso previo a la clonación y análisis funcional de dicho gen.

La adecuación de esta estrategia explica los esfuerzos por parte de la comunidad científica internacional para mantener reservorios de mutantes espontáneos de tomate (e.g. TGRC, Davis) y generar colecciones de mutantes inducidos con EMS, neutrones rápidos o rayos γ (e.g. Emmanuel y Levi, 2002; Menda *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2011; entre otros). Con todo, la identificación de mutantes de inserción (por ejemplo, los generados por T-DNA) representa desde un punto de vista metodológico una de las alternativas más prometedoras toda vez que facilita la posterior clonación del gen etiquetado. De hecho, la mutagénesis insercional se ha convertido en los últimos años en una herramienta básica en programas de genómica funcional dirigidos a la identificación y etiquetado de genes que controlan caracteres relevantes, como paso previo a su clonación y análisis funcional (Krysan *et al.*, 1999). En efecto, la disrupción de un gen endógeno o la integración de un T-DNA en la vecindad del mismo pueden ocasionar la anulación o alteración de su función. Además, el etiquetado del gen proporciona, en principio, el camino más rápido para su clonación mediante el empleo de métodos basados en la PCR (e.g. TAIL- o Anchor-PCR).

5.3. Mutagénesis insercional con T-DNA

El etiquetado con T-DNA fue aplicado por primera vez en *Drosophila melanogaster* (Ballinger y Benzer, 1989; Kaiser y Goodwin, 1990), y ha sido empleado con éxito en *Arabidopsis* (Krysan *et al.*, 1999; Sessions *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003), arroz (Jeong *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; An *et al.*, 2003; Sallaud *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007) y *Medicago truncatula* (Scholte *et al.*, 2002). También se ha puesto en práctica en otras especies vegetales como *Lotus japonicus* (Webb *et al.*, 2000), *Salvia miltiorrhiza* (Lee *et al.*, 2008), *Brachypodium distachyon* (Vain *et al.*, 2008), *Brassica rapa* (Lee *et al.*, 2004), álamo (Harrison *et al.*, 2007), cebada (Zhao *et al.*, 2006), y fresa (Oosumi *et al.*, 2006).

En plantas, *Dwarf* fue la primera mutación insercional mediada por T-DNA que concluyó con la clonación del gen etiquetado (Feldmann *et al.*, 1989). Posteriormente, se han descrito mutantes insercionales de T-DNA alterados en caracteres morfológicos (Feldman *et al.*, 1989; Feldman, 1991; Chiang, 1995), tamaño y forma de las hojas

INTRODUCCIÓN MUTAGÉNESIS INSERCIONAL

(Ogarkova *et al.*, 2001; Van Lijsebettens *et al.*, 1991), estructura de la flor (Yanofsky *et al.*, 1990; Komari, 1990; Jofuku *et al.*, 1994), fertilidad de los gametos masculino y femenino (Robinson-Beers *et al.*, 1992; Modrusan *et al.*, 1994; Howden *et al.*, 1998; Milyaeva *et al.*, 2002; Renak *et al.*, 2014), desarrollo embrionario (Meinke, 1985; Castle *et al.*, 1993; Yadegari *et al.*, 1994; Castle y Meinke, 1994) o resistencia a la infección con *Agrobacterium* (Nam *et al.*, 1999; Tzfira y Citovsky, 2001; Gilliland *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2003a; Zhu *et al.*, 2003b). Conviene indicar que la mayor parte de estas mutaciones se han identificado en *Arabidopsis*. De hecho, un elevado número de inserciones de T-DNA que han sido secuenciadas se encuentran hoy en día disponibles para su análisis *in silico* (revisado por Radhamony *et al.*, 2005).

Por lo que concierne al tomate, los experimentos de mutagénesis insercional se basaron inicialmente en el empleo del sistema *Ac/Ds*, lo que permitió clonar *Cf-9* (Jones *et al.*, 1994), *Dwarf*, (Bishop *et al.*, 1996), *DCL* (Keddie *et al.*, 1996), *FEEBLY* (van der Biezen *et al.*, 1996), *Cf-4* (Takken *et al.*, 1998), *Tm-22* (Lanfermeijer *et al.*, 2003), *LeCER6* (Vogg *et al.*, 2004), *LePT4* (Nagy *et al.*, 2005) o *TAP3* (de Martino *et al.*, 2006). Pese a que la mutagénesis insercional por T-DNA es un método más eficaz que el basado en transposones, lo cierto es que, por lo que respecta al tomate, se han clonado menos genes mediante esta estrategia. La escasez de resultados se explica por la dificultad para generar grandes colecciones de plantas transgénicas de tomate, lo que sin duda requiere un método eficaz y fiable de transformación genética. *ANT1*, que codifica un regulador transcripcional relacionado con la biosíntesis, fue el primer gen clonado partir de una colección de mutantes de inserción generada con un vector de activación transcripcional (Mathews *et al.*, 2003). De la misma forma, en un trabajo en colaboración con el grupo del Dr. Lozano, conseguimos demostrar que el gen etiquetado en el mutante insercional *Arlequín* (Pineda *et al.*, 2010) era *TAGL1* (*TOMATO AGAMOUS LIKE 1*) (Giménez-Camínero *et al.*, 2010). Se comprobó que la mutación *Arlequín* promueve un fenotipo de ganancia de función consecuencia de la expresión ectópica de *TAGL1*. El análisis funcional de *ALQ/TAGL1* indicó que este gen participa en el control genético del desarrollo reproductivo de tomate y desempeña un papel esencial como regulador positivo de la maduración del fruto (Giménez-Camínero

et al., 2010). Más recientemente, se ha demostrado que *ALQ/TAGL1* desempeña un papel importante en el desarrollo de la cutícula (Giménez-Camínero *et al.*, 2015). Asimismo, en el contexto del programa de mutagénesis insercional que estamos abordando en colaboración con los grupos de los Dres. Lozano (Universidad de Almería) y Bolarín (CEBAS, CSIC, Murcia) se ha publicado recientemente el análisis funcional del gen etiquetado en el mutante *ars1* (*altered response to salt stress 1*), un factor de transcripción MYB hasta ahora no descrito (Campos *et al.*, aceptado en *Plant Biotechnology Journal*).

Como se apuntaba en el párrafo anterior, la mutagénesis insercional por T-DNA es un método más eficaz que el basado en transposones. En comparación con la mutagénesis mediante transposones, el T-DNA tiene la enorme ventaja de que sus inserciones son química y físicamente estables a lo largo de las generaciones (Radhamony *et al.*, 2005). Uno de los éxitos de esta estrategia para generar mutantes esta relacionado con los sitios de inserción del T-DNA. Según Franzmann *et al.*(1995), la distribución del T-DNA a lo largo del genoma es aleatoria (al menos hasta cierto punto), ya que no existen puntos calientes o preferenciales de integración. En arroz se ha podido demostrar que el T-DNA es menos propenso a la integración en puntos calientes si se compara con los patrones de integración de los transposones *Tos17* y *Ds* (Miyao *et al.*, 2003, Kolesnik *et al.*, 2004; Sallaud *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013). Alonso *et al.* (2003) indicaron que la integración del T-DNA en *Arabidopsis* no parece exhibir preferencia por ningún grupo funcional de genes. Según An *et al.*(2005), la integración del T-DNA en arroz no parece estar ligada a ninguna clase de genes; en cambio, ciertos transposones (e.g.: *Tos17*) suelen tener preferencia por determinadas clases génicas (e.g.: proteínas kinasas). No obstante, tal y como se indicó en su día (André *et al.*, 1986; Konczet *al.*1989; Herman *et al.*, 1990), la idea que subyace es que el T-DNA suele integrarse preferentemente en regiones transcripcionalmente activas. El análisis de las secuencias flanqueantes al T-DNA en *Arabidopsis* parece indicar que las inserciones ocurren principalmente en regiones ricas en AT (Brunaud *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2003). En tomate, el análisis de las secuencias flanqueantes a 174 insertos de T-DNA indicaron que en un 40% de los casos (69 insertos) la inserción ocurría en

genes que se transcriben (Gidoni *et al.*, 2003). En relación con este aspecto, no se puede descartar que la preferencia del T-DNA por zonas ricas en genes se deba en parte al sistema de selección de las líneas transgénicas, ya que normalmente se suelen seleccionar aquellas que portan insertos funcionales. En este sentido, el propio sistema de selección (e.g.: resistencia a un antibiótico) elimina todos aquellos eventos de integración que no se expresan y que podrían estar localizados en otros sitios muy diversos del genoma de la planta.

Conviene indicar que la mayor parte de estos análisis se han llevado a cabo en la especie modelo por excelencia (*Arabidopsis*), y por tanto los datos podrían no ser extrapolables a otras especies. Por ejemplo, se ha descrito en *Arabidopsis* que el T-DNA tiene tendencia a integrarse en regiones intergénicas (Sessions *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003). En arroz, por el contrario, lo que se ha observado es que el mayor número de eventos de inserción suele ocurrir cerca del codón de inicio ATG (An *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2003; Sallaud *et al.*, 2004). En cualquier caso, los análisis que se han efectuado tanto en *Arabidopsis* como en arroz han puesto de manifiesto las ventajas de emplear la estrategia basada en el empleo de T-DNAs. En este sentido, en ambas especies se ha observado una amplia distribución de los insertos a lo largo del genoma, bajas frecuencias de integración en regiones repetidas e integración preferente en zonas ricas en genes.

5.4. Naturaleza de las mutaciones en las plantas transgénicas

Las alteraciones fenotípicas observadas en las plantas transgénicas no siempre están ocasionadas por la inserción del T-DNA. Los datos experimentales han permitido comprobar que sólo el 35-40% de las alteraciones visibles en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que exhiben un fenotipo mutante se deben al T-DNA (Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997). Por ejemplo, entre las líneas transgénicas de *Arabidopsis* con mutaciones relacionadas con el desarrollo embrionógico, sólo en el 36% de los casos el gen marcador co-segregó con el carácter (Meinke *et al.*, 1994). La ausencia de co-segregación entre el gen marcador y el fenotipo mutante se ha observado también en

mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en la formación de cera en la cutícula de la hoja (12 de 18 mutantes; McNevin *et al.*, 1993) o en la morfología foliar (4 de 5 mutantes; Van Lijsebettens *et al.*, 1991).

Según Negruk *et al.* (1996), la integración del T-DNA puede producir un amplio espectro de las mutaciones que se han descrito en genética clásica, como por ejemplo mutaciones puntuales o micro-delecciones. Asimismo, se ha podido demostrar que la inserción del T-DNA genera distintos tipos de reordenaciones cromosómicas, como por ejemplo translocaciones y duplicaciones (Castle *et al.*, 1993; Laufs *et al.*, 1999; Taxy Vernon, 2001). Tales reordenaciones pueden estar provocadas por recombinación entre repeticiones de las regiones flanqueantes del T-DNA y regiones homólogas del genoma de la planta (Taxy Vernon 2001). Además, el T-DNA puede ser cortado de un sitio y reintegrado en otro junto con secuencias del genoma de la planta que flanquean ese T-DNA (Castle *et al.*, 1993; Ohba *et al.*, 1995; Takano *et al.*, 1997; Fu *et al.*, 2000). La reparación del sitio inicial en el que se había integrado el T-DNA puede generar fragmentos duplicados en el DNA de la planta que podrían ser metilados (Svitashev *et al.*, 2002a; Forsbach *et al.*, 2003).

Además, se ha podido demostrar la integración de secuencias del DNA de *Agrobacterium* (Peterhans *et al.*, 1990; Svitashev y Somers, 2002b) y de fragmentos de DNA correspondientes al cuerpo del vector (sin incluir el T-DNA). En este sentido, se han publicado diversos trabajos en los que se describen mutantes de inserción generados por secuencias del cuerpo del vector (Herman *et al.*, 1990; Tinland, 1996; Cluster *et al.*, 1996; Kononov *et al.*, 1997; Wolters *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2000). A título de ejemplo, Cluster *et al.* (1996) comprobaron que las alteraciones en la coloración de las flores de plantas transgénicas de *Petunia hybrida* se debían a las secuencias del vector. Fu *et al.* (2000) señalaron que la integración de una secuencia de tan sólo 9 pares de bases del vector puede ocasionar diversos tipos de inversiones y translocaciones cromosómicas. En definitiva, la integración de este tipo de secuencias o las reordenaciones y reparaciones genéticas en plantas transgénicas podrían dar lugar a fenotipos mutantes que no están ocasionados, al menos de una forma directa, por el T-DNA, lo que explicaría, al menos en parte, la falta de correlación entre el

fenotipo mutante y el conferido por el gen marcador.

Conviene indicar que la mutagénesis insercional, al igual que ocurre con otras aproximaciones que provocan disrupción génica, tiene algunas limitaciones. Por ejemplo, es difícil detectar un fenotipo mutante si se produce la disrupción de un gen redundante, ya que pueden haber dos o más *loci* que desempeñen la misma función o tengan funciones compartidas. Asimismo, es difícil identificar la función de genes que son requeridos durante las primeras etapas del desarrollo gametofítico o embriogénico, es decir, genes cuya disrupción ocasiona letalidad. Por otro lado, puede ocurrir que un gen se exprese en un pequeño conjunto de células o durante un periodo de tiempo corto y el efecto que produce la pérdida de función no sea distinguible a nivel fenotípico. Adicionalmente, en los casos en los que un gen cumple más de una función, a no ser que se tenga un conocimiento suficiente de las características del material vegetal y que el fenotipado se realice de forma exhaustiva puede ser muy difícil llegar a inferir todas y cada una de las funciones del gen. En este caso, lo más normal es que sólo se llegue a identificar la función más importante, la más temprana durante el desarrollo ontogénico o, simplemente, la más espectacular o fácil de identificar a nivel fenotípico. Este tipo de problemas se podría, no obstante, solventar mediante el uso de vectores modificados.

5.5. Vectores modificados. Etiquetado mediante trampas génicas (*trapping*)

Una de las aplicaciones de la mutagénesis insercional por T-DNA estriba en la detección de elementos de regulación (Meissner *et al.*, 2000). Mediante esta estrategia se intenta explotar la posibilidad de obtener información sobre la función génica a partir de datos relacionados con la expresión. La técnica consiste en introducir al azar en el genoma construcciones que portan, aparte del gen marcador, un gen delator con un promotor mínimo, sin promotor o unido a un sitio aceptor de *splicing*. Por tanto, se trata de analizar las secuencias genómicas junto a las que se inserta la construcción y las propiedades de expresión que confieren éstas al gen delator. El interés de esta estrategia reside en la naturaleza dual de las trampas, ya

que por un lado generan mutaciones de inserción de T-DNA y por otro permiten estudiar el patrón de expresión del gen etiquetado. De esta forma, no sólo se pueden hacer inferencias en torno a la función del gen etiquetado en un determinado mutante de inserción a través del fenotipado en TG1 o TG2, sino que también se puede obtener un panorama bastante preciso en torno al patrón de expresión espacio-temporal de dicho gen, ya que por el peculiar diseño de las trampas la expresión del gen delator mimetiza la expresión del gen endógeno etiquetado.

El delator más comúnmente utilizado es el gen bacteriano *UidA* que codifica la proteína GUS. Otra alternativa es el uso de la proteína fluorescente verde – *GFP* – (Haseloff *et al.*, 1997) o del gen *Lc* de maíz (Goldsbrough *et al.*, 1996). Sin embargo, por comparación, la observación microscópica de la tinción GUS es tremendamente más sensible que la de otros genes delatores (e.g.: *GFP* o *Luc*) ya que permite su detección en unas pocas células (Topping *et al.*, 1994; Sundaresan *et al.*, 1995; Campisi *et al.*, 1999; He *et al.*, 2001). Según Jefferson *et al.* (1987), la detección de actividad GUS es muy sensible pudiendo detectarse la expresión en una única célula mediante técnicas histoquímicas.

Hay tres tipos de trampas génicas que usualmente se denominan como trampas de intensificadores, promotores y genes (Springer, 2000). La trampa de intensificadores consiste en un T-DNA sencillo que, aparte del gen marcador, contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *UidA* justo al lado del borde derecho. El promotor mínimo no es capaz de promover un nivel de transcripción detectable, pero su inserción en el área de actuación de un determinado intensificador, y en la dirección correcta, activa la expresión del delator, mimetizando el patrón de expresión que dicho intensificador confiere al gen endógeno (figura 13A). Es decir, permite identificar y analizar el patrón de expresión de un gen (y por tanto llegar a una inferencia sobre su función) analizando la expresión del delator. La trampa de promotores es idéntica a la anterior, pero eliminando el promotor mínimo. Para que funcione, el T-DNA debe insertarse dentro de uno de los exones de un gen (figura 13B). La trampa de genes tiene un sitio aceptor de *splicing* justo antes de la región

estructural del delator, de forma que sólo funciona cuando el T-DNA se integra dentro de un intrón (figura 13C).

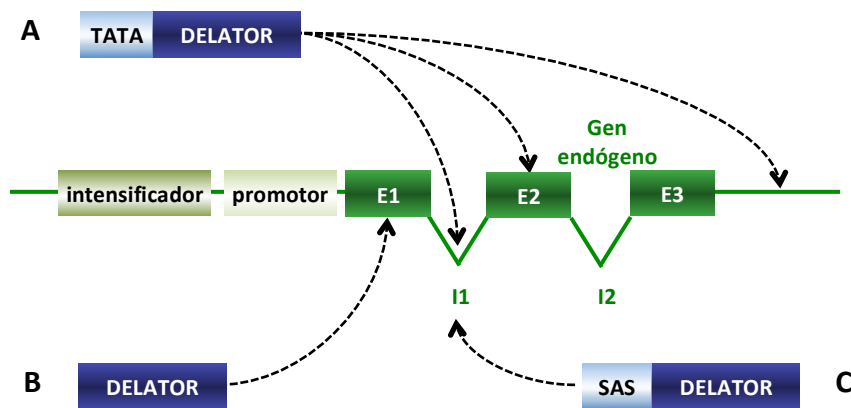


Figura 13. Construcciones utilizadas en los diversos tipos de trampas génicas (azul). Las flechas indican los sitios de inserción en un hipotético gen endógeno (verde) que darían lugar a la activación del gen delator (adaptado de Hueros y Jouve, 2002). A: trampa de intensificadores. B: trampa de genes. C: trampa de promotores.

E1, E2, E3: exones; I1, I2: intrones; TATA= promotor mínimo (caja TATA); SAS= sitios de aceptación de “splicing”.

Cada tipo de trampa tiene sus ventajas e inconvenientes. La ventaja de la trampa de intensificadores es que, como para que funcione basta que se inserte en el área de actuación de un intensificador, el número de genes que se detectan es mayor. Por ejemplo, los estudios realizados por Kertbundit *et al.* (1991) y Topping y Lindsey (1995) revelaron que la proporción de insertos que desencadenan expresión del gen delator estaba en torno al 25% usando una trampa de promotores y 50% con una trampa de intensificadores. El inconveniente, estriba en que, como puede funcionar a una distancia considerable, a la hora de clonar el gen, el esfuerzo requerido puede ser mayor. En este sentido, puede resultar difícil determinar qué secuencia genómica es responsable de tal patrón de expresión. Por lo que respecta a las trampas de promotores y de genes, el inconveniente es que, como para que funcionen deben integrarse dentro de un exón o de un intrón, respectivamente, el número de genes que van a detectarse es menor. La ventaja es que el gen queda estrictamente

etiquetado y que si se produce una fusión traduccional (i.e. una unión entre el producto del delator y el producto total o parcial del gen endógeno) no sólo puede hacerse un análisis funcional del gen, sino que además pueden obtenerse datos de la localización intracelular del producto del gen endógeno.

Otro aspecto que merece tenerse en cuenta es la versatilidad de la trampa de intensificadores, ya que puede actuar como una trampa de promotores, cuando se inserta dentro de uno de los exones del gen, o como una trampa de genes, cuando se inserta dentro de un intrón.

Con independencia del tipo elegido, el empleo de trampas tiene grandes ventajas sobre la mutagénesis insercional *sensu stricto* (i.e. con un vector convencional) al permitir la identificación de genes: i) funcionalmente redundantes; ii) los que se expresan en múltiples estados de desarrollo y producen efectos pleiotrópicos que generan confusión al llevar a cabo el fenotipado; iii) aquellos cuya disrupción provoca letalidad temprana; y iv) genes cuya disrupción ocasiona un fenotipo tan sutil que a veces no llega a detectarse en el fenotipado de las plantas (en este caso, la expresión del delator da una pista para identificar el fenotipo durante la evaluación). La identificación del gen es, además, independiente del nivel de expresión del mismo, evitando el peligro de descartar genes de baja expresión pero con efectos muy relevantes (e.g. *ovate*; Liu *et al.* 2002), tal y como a veces ocurre cuando se emplean otras aproximaciones, como por ejemplo las de tipo transcriptómico. Es, por último, el método ideal para detectar genes que se activan o inactivan en respuesta a un estímulo externo o situaciones de estrés abiótico.

Según Bellen (1999), la probabilidad de que las trampas reflejen la expresión de un gen endógeno próximo es muy alta. Además, hasta la fecha, los genes endógenos detectados con este sistema y que, con posterioridad, se han llegado a clonar mimetizan el patrón de expresión que había sido observado previamente con la trampa (Grossniklaus *et al.*, 1989; Springer *et al.*, 1995; Guet *et al.*, 1998; Campisi *et al.*, 1999; Swaminathan *et al.*, 2000).

INTRODUCCIÓN MUTAGÉNESIS INSERCIONAL

El empleo de trampas génicas ha dado resultados positivos en *Arabidopsis*, conduciendo, por ejemplo, a la identificación de los genes *PROLIFERA (PRL)* (Springer *et al.*, 1995, 2000), *FRUITFULL (FUL)* (Guet *et al.*, 1998) y *EXORDIUM (EXO)* (Farrar *et al.*, 2003), entre otros. Por otro lado, los sistemas basados en el empleo de trampas han permitido la clonación de promotores específicos de ciertos tejidos u órganos, como embriones (*Arabidopsis*; Topping *et al.*, 1994), cubierta de la semilla (tabaco; Fobert *et al.*, 1994), o células meristemáticas (*Arabidopsis*, Farrar *et al.*, 2003). En la actualidad, existe una amplia colección de líneas *trapping* (es decir, generadas con trampas génicas) en *Arabidopsis* (Sundaresan *et al.*, 1995; Campisi *et al.*, 1999; Alvarado *et al.*, 2004), arroz (Jeon *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Sallaud *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2005), tomate Microtom (Meissner *et al.*, 2000) y álamo (Groover *et al.*, 2004).

Conviene señalar que, aunque los genes y promotores identificados en estos análisis no se hayan caracterizado en detalle, la información obtenida puede ser utilizada para el estudio de patrones de desarrollo en los que es crucial disponer de marcadores específicos de células y tejidos (Hueros y Jouve, 2000). Aunque aún queda mucho camino por recorrer, los trabajos realizados hasta la fecha ilustran el potencial de esta tecnología en genómica funcional.

OBJETIVOS

En colaboración con los grupos del Dr. Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia), nuestro grupo está abordando un programa de mutagénesis insercional en tomate y especies relacionadas. Para ello, se han generado líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de especies silvestres (*S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae* y *S. pennellii*), la mayor parte con una trampa de intensificadores. La disponibilidad de esta amplia colección de líneas T-DNA ha permitido identificar genes de tomate que controlan caracteres del desarrollo relevantes a nivel agronómico y avanzar en el conocimiento de la base genética de la tolerancia a estrés abiótico en tomate cultivado y silvestre. Esta Tesis Doctoral se enmarca en el contexto de este programa de mutagénesis insercional y tiene como principal objetivo seguir ampliando la colección de líneas T-DNA de tomate, identificar nuevos mutantes con cambios en el desarrollo vegetativo o reproductivo, y caracterizar una serie de mutantes que exhiben desarrollo partenocárpico del fruto.

En este marco general, los objetivos concretos planteados para esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Generar una nueva colección de líneas de T-DNA de tomate (cv. Moneymaker) con una trampa de intensificadores (vector pD991)
2. Evaluar la colección de líneas T-DNA (plantas TG1) para identificar mutaciones de naturaleza dominante, semidominante o aditiva
3. Caracterizar mutantes que exhiban desarrollo de fruto partenocárpico mediante:
 - 3.1. Análisis fenotípico del desarrollo vegetativo y reproductivo
 - 3.2. Análisis histológico del desarrollo reproductivo
 - 3.3. Análisis del patrón de expresión del delator *Uida*
 - 3.4. Análisis genético en progenies de retrocruce

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL
2. TÉCNICAS BÁSICAS DE CULTIVO *IN VITRO*
3. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA
4. CARACTERIZACIÓN DEL DESARROLLO REPRODUCTIVO
5. ANÁLISIS DE CO-SEGREGACIÓN
6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL DELATOR

1. MATERIAL VEGETAL

Como material vegetal de partida se ha utilizado el cv. de tomate Moneymaker. Este cultivar fue introducido por el inglés F. Stonor a mitad del siglo pasado y es muy popular debido a que produce frutos de un atractivo y brillante color rojo cadmio que exhiben una increíble uniformidad, tanto su morfología como el proceso de maduración. Como suele ocurrir en algunas variedades y cultivares comerciales después de numerosos ciclos de autofecundación, Moneymaker posee un fondo genético muy conservado que le proporciona caracteres de fruto muy homogéneos y una heredabilidad asegurada.

2. TÉCNICAS BÁSICAS DE CULTIVO *IN VITRO*

2.1. Esterilización de semillas

Las plántulas axénicas se obtienen a partir de semillas que, previamente, han pasado por un proceso de esterilización. Las semillas se esterilizan superficialmente por inmersión, durante 30 minutos, en una solución de lejía comercial diluida al 50% (5% de hipoclorito de sodio) equivalente a 50 g de cloro activo por litro, a la cual se añaden 2 gotas de detergente 7X-0-matic (Flow Laboratories) que ayuda a romper la tensión superficial de los tejidos, mejorando el contacto entre el tejido y el esterilizante. A continuación, se elimina la solución desinfectante mediante tres lavados sucesivos (5, 10 y 15 minutos, respectivamente) con agua destilada estéril.

2.2. Germinación y obtención de plántulas axénicas

Las semillas esterilizadas (apartado 2.1) se transfieren a placas petri con dos capas de papel filtro saturado de agua destilada estéril. Las placas, selladas con parafilm, se mantienen en oscuridad a 28°C hasta la germinación de las semillas, periodo que oscila entre las 48 y 72 horas. Después de la nascencia, es decir, en el momento en el que emerge la radícula, las semillas se transfieren directamente a recipientes de vidrio

de 105 mm de altura x 95 mm de diámetro que contienen 50 ml de medio de cultivo MG. Este medio está compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar bacteriológico europeo (Sumilab, s.l.). El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante. Los medios de cultivo se esterilizan por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos. El cultivo de las plántulas tiene lugar en una cámara de cultivo en condiciones de luz, temperatura y humedad controladas: fotoperiodo de 16 horas luz con una intensidad luminosa de 2000 luxes - equivalente a $34 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ - suministrada por una fuente de luz fría y una temperatura / humedad relativa de $26 \pm 2^\circ \text{C}$ / 40% durante el periodo luminoso y $22 \pm 2^\circ \text{C}$ / 70% durante el periodo oscuro.

Si las plantas se cultivan en invernadero para obtener progenies, tras la germinación, las semillas se siembran en macetas de plástico (65 mm de altura x 95 mm de diámetro) con fibra de coco estéril.

2.3. Cultivo de explantes primarios

A los 7-10 días del inicio de la germinación se procede a la extracción de los explantes de cotiledón. Una vez separados los dos cotiledones de la plántula se eliminan los extremos para incrementar la superficie de corte obteniéndose 2 explantes por genotipo individual. Una vez cortados, los explantes se cultivan con el envés en contacto con el medio de cultivo. Para el cultivo de explantes se emplean placas petri (90 mm de diámetro x 30 mm de altura) con 30 ml de medio de cultivo, selladas con parafilm. Las condiciones de incubación son las mismas que las descritas en el apartado 2.2.

2.4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios

2.4.1. Inducción de organogénesis

El medio de cultivo que se utiliza para inducir organogénesis en los explantes de tomate es el IKZ 4.0/4.0/1.0 compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 30 g/L de sacarosa, 10 m/L vitaminas SH, 0,1 g/L de inositol, 4.0 mg ácido indolacético,

4,0 mg/L de quinetina 1,0 mg/L zeatina y 8 g/L de agar bacteriológico europeo (Sumilab, s.l.). Este medio de cultivo da lugar a la formación de callos que presentan zonas compactas de color verde a partir de las cuales se desarrollan yemas, yemas-ápice y brotes. Estos callos se subcultivan cada 21 días para favorecer el desarrollo y amplificación de las estructuras organogénicas. Una vez formado el callo, se suele eliminar la zeatina del medio de cultivo para favorecer la elongación de los brotes.

2.4.2. Enraizamiento de los brotes y clonación de las plantas

Los brotes se separan del callo organogénico y se siembran en un medio de clonación (I 0.1) compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa, 0,1 g/L de inositol, 0,001 g/L de T-CLH y 0,1 mg/L de ácido indolacético para favorecer la emisión de raíces. El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante. El medio de cultivo se esteriliza por calor húmedo en autoclave, a 115º C durante 30 minutos. Las primeras raíces suelen aparecer aproximadamente a los 7 días de la siembra. A los 30 días la planta suele tener un sistema radicular bien desarrollado, y la parte aérea presenta una yema caulinar y varias yemas axilares, a partir de las cuales se pueden obtener nuevas plantas mediante propagación por vía axilar. El tipo de recipiente que utilizamos (150 mm de altura x 60 mm de diámetro) favorece la elongación de entrenudos, lo que facilita la propagación clonal. Ésta se realiza a través del cultivo del brote terminal y las yemas axilares en el medio de clonación descrito anteriormente.

2.5. Determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas mediante citometría de flujo

El nivel de ploidía de las plantas se determina en fragmentos de hoja joven. El análisis se realiza mediante la cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células según el método de Smulders *et al.* (1994). El tejido vegetal (un fragmento de cotiledón u hoja de aproximadamente 1 cm²) se trocea finamente con una cuchilla en una placa petri de 50 mm de diámetro. Se añaden 2 gotas de tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Germany) y 800 µL de una solución que contiene 1mg/L de

fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec) cuya función es teñir el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtra a través de una malla de nylon de 50 μm . La suspensión de núcleos se hace circular por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Ploidy Analyser), equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366nm. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10 μm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), donde es iluminada por una fuente de luz ultravioleta. Como consecuencia, el fluorocromo DAPI fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN del núcleo, que es reconocida y captada por un fotorreceptor. El sistema informático que lleva incorporado el citómetro convierte cada señal fluorescente en un punto sobre la pantalla que se sitúa en distintas posiciones de acuerdo con su intensidad. El gráfico resultante ordena los datos según el contenido nuclear de ADN en el eje de abscisas y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas.

2.6. Re-introducción de brotes a condiciones de cultivo *in vitro*

A partir de plantas cultivadas en el invernadero se pueden volver a re-introducir plantas a condiciones de cultivo *in vitro*. Para ello, se seleccionan segmentos de 3-4-cm de longitud que contengan una yema axilar o terminal. La esterilización se realiza tal y como se describe en el apartado 2.1, salvo la primera etapa correspondiente a la inmersión en la solución de lejía comercial diluida al 50% que tiene una duración de 10 minutos. Posteriormente se eliminan las zonas terminales del segmento nodal o región basal del segmento apical y se transfieren a un medio de enraizamiento como se describe en el apartado 2.4.2: 'Enraizamiento de los brotes y clonación de las plantas'. Las condiciones de incubación son las mismas que las descritas en el apartado 2.2.

3. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

El protocolo que se ha empleado para llevar a cabo los experimentos de transformación genética es básicamente el descrito en Atarés *et al.* (2011), pero utilizando explantes de cotiledón de 7-10 días.

3.1. *Agrobacterium tumefaciens*: cepa bacteriana, plásmido y genes incluidos en el T-DNA

Se ha utilizado la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 y el plásmido pD991 (cedido amablemente por el Dr. Tomas Jack, Dpto. de Ciencias Biológicas, Universidad de Dartmouth, figura 14). El T-DNA contiene el gen marcador *nptII* bajo el control del promotor *mas* con el terminador *mas*, así como un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *UidA*.

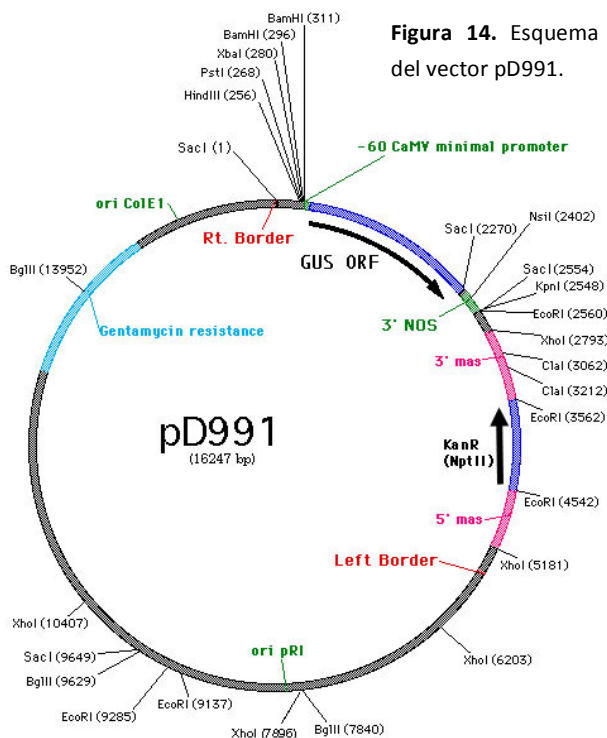


Figura 14. Esquema del vector pD991.

3.2. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens se cultiva a partir de un inóculo glicerinado (mantenido en congelador a -80° C) en medio sólido selectivo LB (Maniatis *et al.*, 1982) suplementado con 100 mg/L de gentamicina y 40 mg/L de rifampicina. Las colonias que crecen en este medio se utilizan de inóculo para el cultivo en medio LB líquido que

se realiza en matraces adecuados para el cultivo de bacterias. Los matraces se tapan con algodón graso (o hidrofóbico) para favorecer la aireación y se incuban en oscuridad a 28° C en agitador orbital a 230 r.p.m. El 'caldo nutritivo' utilizado para el crecimiento bacteriano está suplementado con 100 mg/L de gentamicina y 40 mg/L de rifampicina. El medio líquido para la inoculación de los explantes se suplementa con 200 µM de acetosyringona (3'5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone) esterilizada por microfiltración (Millipore 0,45 µm). La acetosyringona es una sustancia inductora de los genes *vir* en cepas productoras de octopina de *Agrobacterium tumefaciens* (Stachel *et al.*, 1985).

3.3. Método de transformación: selección y regeneración de plantas transgénicas

Los explantes de cotiledón de plántulas axénicas de 7-10 días (ver apartados 2.2 y 2.3) se transfieren a placas petri que contienen medio IK 4.0/4.0 (24 explantes/placa) en el que permanecen 24 horas en estufa de oscuridad a 28°C. A las 24 horas, los explantes se sumergen durante 10 minutos en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. Tras la inoculación, los explantes se secan sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de bacterias y, a continuación, se colocan sobre un medio de cocultivo con el envés en contacto con el medio. El medio de cocultivo es el IK 4.0/4.0 al que se le añade 200 µM acetosyringona. Las bacterias se incuban con el tejido durante 24-48 horas en oscuridad a 28° C, periodo durante el cual se va a producir la transferencia del T-DNA. Para la eliminación de la bacteria, los explantes se tratan durante 10-12 minutos con una solución líquida ajustada a un pH de 5,7 que contiene solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa, 0,1 g/L de inositol, 0,001 g/L de T-CIH y 500 mg/L de cefotaxima (antibiótico utilizado para detener el crecimiento bacteriano). Tras el lavado, los explantes se secan sobre papel de filtro y se colocan sobre el medio IK 4.0/4.0 (apartado 2.4) + cefotaxima (300 mg/L), permaneciendo 2-3 días en la cámara de cultivo bajo las condiciones de incubación descritas en el apartado 2.2. Finalmente, los explantes se transfieren al medio selectivo IKZ 4.0/4.0/1.0 que contiene, además de los componentes descritos para el

medio (apartado 2.4), 100 mg/L de kanamicina (antibiótico utilizado para la selección de células transgénicas) y 300 mg/L de cefotaxima (antibiótico utilizado para detener el crecimiento bacteriano). Los medios de cultivo se esterilizaron por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos. La zeatina, kanamicina y cefotaxima se esterilizaron por microfiltración (Millipore 0.45 µm) y se añadieron al medio de cultivo en la cabina de flujo (condiciones de asepsia). Los explantes se cultivaron en la cámara de cultivo bajo las condiciones de incubación descritas en el apartado 2.2. La combinación de reguladores del medio IKZ 4.0/4.0/1.0 da lugar a la formación de callos que presentan zonas compactas de color verde en las que se desarrollan yemas, yemas-ápice y brotes.

Se precisan varias transferencias al mismo medio selectivo para conseguir el desarrollo de ápices individualizables. Estas transferencias se realizan cada 2-3 semanas. A los 3-4 subcultivos en medio selectivo se elimina la zeatina para favorecer la elongación de los brotes, que posteriormente se separan y cultivan en un medio de clonación (siguiente apartado). Las condiciones de incubación son las descritas en el apartado 2.2.

3.4. Enraizamiento de los brotes transgénicos

Los brotes elongados se separan del callo organogénico y se cultivan como se describe en el apartado 2.4. Durante la etapa de propagación clonal, una de las copias se utiliza para realizar el test de enraizamiento en medio selectivo (medio I 0.1 con 100 mg/L de kanamicina), lo que nos aporta una información muy fiable sobre el carácter transgénico de la planta en cuestión sobre la base de la expresión del gen marcador seleccionable *nptII*. Las condiciones de incubación para el enraizamiento de los brotes son las descritas en el apartado 2.2. El nivel de ploidía de las plantas transgénicas se analiza tal y como se describe en el apartado 2.5.

3.5. Aclimatación y trasplante

A los 15-20 días de la siembra en medio de enraizamiento, las plantas se encuentran en el estadio adecuado para llevar a cabo la aclimatación. Tras extraer la

planta del bote, se aplica un lavado a la raíz para eliminar los restos de agar, procurando no dañarla. A continuación se trasplanta a una maceta pequeña (polietileno negro \varnothing : 9 cm, Os-plastic) que contiene fibra de coco estéril (fibra de $\frac{3}{4}$ de Cocoterra) y se cubre con un vaso de plástico transparente. Las plantas se trasladan a un invernadero tipo capilla en las siguientes condiciones de cultivo: i) fotoperiodo: 16 horas luz / 8 horas oscuridad, ii) temperatura: $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (diurna), $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (nocturna), humedad relativa: 45-65% (diurna), 75-90% (nocturna), y iii) luz natural suplementada con lámparas de mercurio de 400 w para mantener un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). Se riega a demanda con la siguiente solución nutritiva: 0,15 g/L de PO_4H_3 , 0,82 g/L de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,20 g/L de NO_3K , 0,35 g/L de SO_4K_2 , 0,24 g/L de SO_4Mg y 0,1 g/L de BMX (micronutrientes). A los 15 días se puede retirar el vaso de plástico y transferir la planta a un recipiente de cultivo de mayor calibre (polietileno negro \varnothing : 28 cm, capacidad 12 L, Maceflor). A partir de este momento, las necesidades de riego se cubren mediante fertirrigación con la solución nutritiva descrita anteriormente, colocando 2 goteros por maceta (el número y duración de los riegos varía con el estadio de desarrollo de la planta, incrementándose el número y la extensión de los mismos en función de los requerimientos hídricos). A los 3-4 meses se realiza la recolección de los frutos en estadio maduro para la extracción de las semillas.

3.6. Polinización cruzada

La polinización cruzada se lleva a cabo aplicando polen de la flor donadora (obtenido en el estadio de desarrollo en el que las anteras están dehiscentes, es decir, en estadio de anthesis) sobre el estigma del carpelo de la flor receptora (en un estadio de desarrollo anterior en el que produce la dehiscencia de la antera, es decir, en estadio de preantesis). Para ello, se recolectan flores en anthesis del parental donador. Mediante la aplicación de golpes repetidos sobre una placa pequeña de petri ($\varnothing = 45$ mm, placas Corning), el polen se deposita en el interior de la placa. Posteriormente, se emascula la flor receptora para polinizar con el polen recolectado.

4. CARACTERIZACIÓN DEL DESARROLLO REPRODUCTIVO

4.1. Caracterización de flores

4.1.1. Estadios del desarrollo floral evaluados

Se seleccionaron estadios en los que se pudieran analizar cambios relevantes en la génesis de los verticilios reproductivos (i.e. tercer y cuarto verticilio). Se estudiaron los estadios de botón floral temprano (BF1), botón floral tardío (BF2), preantesis, antesis, post-antesis temprana (2 DPA) y post-antesis tardía (7 DPA), acorde con los parámetros del desarrollo floral establecidos por Brukhin *et al.* (2003) (ver tabla 2).

4.1.2. Análisis de la viabilidad de los granos de polen

La viabilidad de los granos de polen se analizó utilizando el método de fijación y tinción de los cromosomas con una solución de acetato de carmín que tiñe el ADN de rojo. Para ello, se colocan los granos de polen sobre un portaobjetos y se tiñen con una solución de acetato de carmín. Tras la tinción, las muestras se observan al microscopio óptico. Para evaluar la tasa de viabilidad del polen se emplearon 4-5 flores de cada genotipo y estadio de desarrollo y se contabilizaron en torno a 200 y 300 granos de polen por flor.

La solución de acetato de carmín se prepara diluyendo 0,05 g de carmín en 10 mL de ácido acético glacial al 45% y calentando hasta la ebullición. Posteriormente, la preparación se filtra a través de una malla con poros de 15-20 μm para eliminar los residuos sólidos no diluidos. A continuación, se diluye al 1:1 en glicerol al 30%.

Tabla 2. Morfología de la flor de tomate cv. 'Moneymaker' y estado de desarrollo de los órganos reproductivos (adaptado de Brukhin *et al.*, 2003).

Estado	Morfología de la flor (criterios de reconocimiento)	Estadios de desarrollo de los órganos reproductivos		Estado de desarrollo floral descrito por Brukhin <i>et al.</i> (2003)
		Estambre	Carpelo	
BF1	Sépalos cerrados. Longitud del botón floral: 5-7mm.	Polen en estadio de tétradas de microsporas, o de microsporas de forma irregular libres de calosa.	Iniciación del tegumento en los óvulos. Inicio de la meiosis en algunos de ellos.	10-11
BF2	Sépalos cerrados. Longitud del botón floral: 8-10mm.	Polen en estadio de microsporas de forma irregular libres de calosa.	La mayoría de los óvulos han iniciado la meiosis, en algunos se empieza a diferenciar el saco embrionario.	12-13
PreA	Sépalos y pétalos abiertos con un ángulo de aproximadamente 45°. Como estaminal de color verde.	Diferenciación de los núcleos vegetativo y generativo en el grano de polen que empieza a acumular cuerpos lipídicos.	Los óvulos se encuentran completamente diferenciados y anátropos.	18-19
Ant	Sépalos y pétalos abiertos con un ángulo $\geq 180^\circ$. Como estaminal de color amarillo.	Dehiscencia de las anteras (apertura de los sacos polínicos) y liberación del polen	Los óvulos están maduros.	20
2DPA	Los pétalos se cierran y se arrugan, pero todavía son de color amarillo brillante.	Los granos de polen ya se han depositado en el estigma.	Todos los tejidos del ovario entran en fase de intensas divisiones celulares.	-
7DPA	Los pétalos y el cono estaminal se encuentran completamente senescentes y a punto de caerse.	-	Los ciclos de división celular se ralentizan y empieza una fase de expansión celular.	-

Ant= antesis, BF1= botón floral 1, BF2= botón floral 2, PreA= preantesis, n DPA= n días postantesis.

4.1.3. Preparación de muestras para microscopía óptica

El análisis histológico se realizó incluyendo las muestras en parafina y realizando cortes que se tiñeron con azul de toluidina para su observación en el microscopio óptico.

Inclusión en parafina

Las muestras se fijan en FAE (10% de formaldehído al 3,7%, 5% de ácido acético glacial y 50% de etanol absoluto) inmediatamente después de su recolección. Posteriormente se someten a dos pulsos de vacío, de 5 min cada uno, se les cambia la solución de fijación y se mantienen en esta solución de 4 y 16 h a 4°C. Tras la fijación, los tejidos se deshidratan mediante lavados de 30 min en etanol a concentraciones crecientes (15%, 30%, 50%, 70%). A partir de esta etapa las muestras se pueden conservar a 4°C en etanol al 70% indefinidamente.

La inclusión en parafina se realiza mediante series de etanol 100%:Histo-Clear, Histo-Clear e Histo-Clear:parafina (Histo-Clear, histological clearing agent, National Diagnostic) durante 4 horas en cada paso, hasta llegar a parafina pura (Paraplast embedding media, Sigma), donde se mantienen a 58°C durante 2 días, realizando 3 cambios de parafina cada día. En este momento, la parafina con las muestras se vierte en moldes adecuados, y se almacenan a 4°C hasta la realización de los cortes.

Cortes histológicos

Las muestras incluidas en parafina se seccionan en un microtomo rotatorio Microm a un espesor de 0,7µm. Los cortes que se obtienen se colocan en un baño de agua a 37°C y se montan sobre portaobjetos de adhesión, Polysine® (Termo scientific). Posteriormente se secan sobre una placa térmica a 40°C durante 16 h.

Tinción con azul de toluidina

El azul de toluidina es un colorante metacromático que tiñe la mayoría de los tejidos vegetales. Teñidos con este colorante, distintos componentes adquieren un color específico. Por ejemplo, el ADN: color azul o verde-azulado, Algunos polifosfatos,

polisulfatos y ácidos policarboxílicos (incluyendo ácido algínico y ácidos pécticos): color rojo, y Lignina y algunos polifenoles: verde, azul turquesa.

A la sección de tejido incluido en parafina sobre el portaobjetos se le elimina la parafina en Histo-Clear durante 10 min, y luego se rehidrata en soluciones decrecientes de etanol/agua (100% - 10 min, 90% - 5 min, 70% - 5 min, 50% - 5 min), y finalmente en agua destilada durante 10 min. La tinción de las secciones sin parafina se realiza con azul de toluidina 0,01% en agua, durante 4 min. Después se realiza un lavado con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Las observaciones y registro fotográfico se realizaron en un microscopio óptico Eclipse 600 (Nikon).

4.2. Caracterización de frutos

4.2.1. Estadios de desarrollo del fruto evaluados

El desarrollo del fruto se ha analizado en cinco estadios, a saber, verde inmaduro, verde maduro, pintón, rosa y rojo maduro. Se trata de estadios fácilmente reconocibles a nivel visual y, hasta la fecha, se han podido correlacionar con etapas claves del desarrollo (Giovannoni, 2004).

El estadio de verde inmaduro corresponde a frutos de color verde pálido, en fase de crecimiento, aunque dependiendo del tamaño este crecimiento se debe a procesos de multiplicación (los 14 primeros días postantesis) o de expansión celular (entre 14 y 28 días postantesis). En estadio de verde maduro, el fruto ha detenido su crecimiento y adquiere un tono verde más oscuro. En el estadio de fruto pintón, reconocible por la aparición de las primeras zonas de color rojizo, se incrementa de manera drástica la síntesis de etileno y la respiración. Finalmente, en estadio rojo maduro, el fruto presenta una tonalidad completamente roja y un claro ablandamiento, señales de cambios profundos en la composición interna de fruto. Este estadio corresponde con la etapa final de la maduración de la semilla.

4.2.2. Evaluación de las características del fruto

Para la evaluación del tamaño del fruto se determinó el peso, la altura, el diámetro mayor del fruto (diámetro 1) y el diámetro perpendicular al diámetro 1 (diámetro 2) (figura 15).

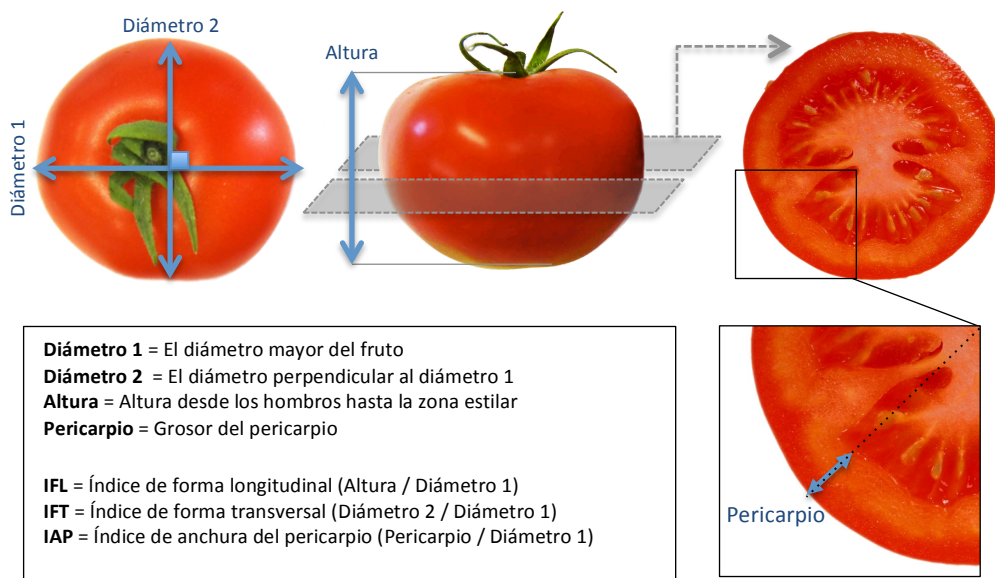


Figura 15. Caracteres evaluados en el fruto de MoneyMaker (índices analíticos). Además se determinó el peso de fruto, número de lóculos y número de semillas por fruto.

La forma del fruto se estudió con dos índices analíticos: el índice de forma longitudinal (IFL), que resulta de dividir la altura del fruto por el diámetro mayor, y el índice de forma transversal (IFT), resultado de dividir el diámetro de menor valor por el diámetro de mayor valor. Respecto al interior del fruto, se contabilizó el número de lóculos y el número de semillas por fruto. Asimismo, se estimó la anchura del pericarpio. Teniendo en cuenta que el grosor del pericarpio varía dependiendo del tamaño del fruto (a menor tamaño, menor grosor), decidimos calcular el índice de anchura del pericarpio (IAP), que resulta de dividir el grosor del pericarpio por el diámetro mayor del fruto. Este índice permite realizar comparaciones entre dos líneas que producen frutos de diferente calibre.

5. ANÁLISIS DE CO-SEGREGACIÓN: RESISTENCIA A LA KANAMICINA EN BROTES REINTRODUCIDOS A CONDICIONES *IN VITRO*

El análisis de la resistencia a la kanamicina en brotes reintroducidos a condiciones *in vitro* se llevó a cabo para determinar la existencia de co-segregación en plantas de las progenies de retrocruce.

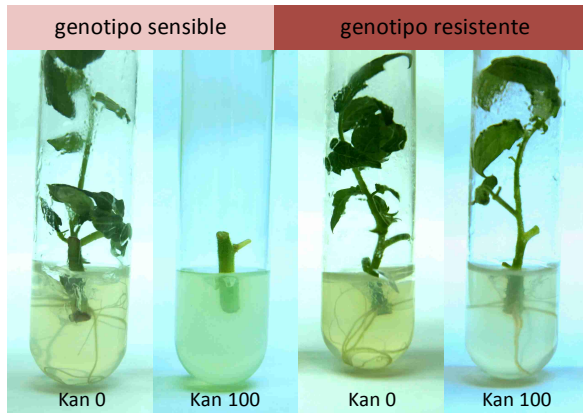


Figura 16. Brotes cultivados *in vitro* en medio de clonación sin o con 100mg/L de kanamicina (Kan0 o Kan100) tras 15 días de cultivo.

La reintroducción de los brotes se realizó tal y como se describe en el apartado 2.6. Al cabo de 30 días de cultivo en medio de clonación (ver apartado 2.4.: ‘enraizamiento de los brotes y clonación de las plantas’), se comprobó que los todos brotes habían enraizado correctamente. Posteriormente, cada genotipo se propagó clonalmente cultivando 2 réplicas en medio en medio de clonación y 4 réplicas en medio de clonación suplementado con 100 mg/L de kanamicina (figura 16). Los resultados del experimento (resistencia o sensibilidad a la kanamicina) se leyeron a los 15 días de cultivo de los brotes en medio selectivo.

6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN DELATOR *UidA*

Los tejidos que expresan el gen *UidA*, en contacto con el reactivo X-Gluc (tabla 6) adquieren una coloración azul (Jefferson *et al.*, 1986; Jefferson, 1987; Jefferson *et al.*, 1987). El ensayo se llevó a cabo para analizar la expresión del delator en las líneas T-DNA. La trampa de intensificadores que hemos utilizado para generar las líneas T-DNA contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *UidA*. El promotor no se expresa salvo si se integra en el área de actuación de las señales de regulación de un gen endógeno. Así, analizando la expresión del delator, se obtiene el patrón de expresión espacio-temporal del gen etiquetado.

El ensayo GUS se realizó con órganos o tejidos que se incubaron durante 24 horas a 37° C en solución tamponada (pH 7.0) de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucurónido (X-Gluc, Sigma) (tabla 3). Para visualizar mejor la coloración azul en los tejidos, la clorofila de los explantes se eliminó posteriormente con lavados sucesivos de etanol (70%). Las muestras se observaron en una lupa binocular.

Tabla 3. Composición de la solución tamponada X-Gluc.

Producto	Concentración
X-Gluc	1 mM
Tampón Na ₃ PO ₄ pH 7	100 mM
EDTA	10 mM
K-Ferricyanide (FeIII)	0,5 mM
K-Ferricyanide (FeII)	0,5 mM
Triton X-100	0,1 %

Se añade a la solución final el 20% en volumen de metanol.

En cada mutante se analizaron los órganos que se indican en la tabla 4. Respecto a los frutos, se analizaron secciones de unos 0,5 mm en frutos más jóvenes y de en torno a 3 mm en frutos en estadios más avanzados (i.e. verde maduro a rojo maduro).

Tabla 4. Órganos o tejidos y estadios de desarrollo analizados en el ensayo histoquímico GUS.

Parte Vegetativa	Parte Reproductiva	
	Flor	Fruto
Hoja joven	botón floral 1	1 cm (14 DPA)
Hoja adulta	botón floral 2	verde inmaduro
Ápice	preantesis	verde maduro
Yema axilar	antesis	pintón
Tallo joven	2 DPA	rosa
	7 DPA	rojo maduro

En la hoja se analizan el limbo, el peciolo y el raquis.

n DPA= n días postantesis.

Para cada órgano o tejido, en cada estadio, se realizaron un mínimo de 3 repeticiones.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL CULTIVAR DE TOMATE “MONEYMAKER”
2. GENERACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE LÍNEAS T-DNA DE TOMATE (CV. MONEYMAKER) E IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES DOMINANTES CON ALTERACIONES EN EL DESARROLLO
3. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE FRUTO PARTENOCÁRPICO

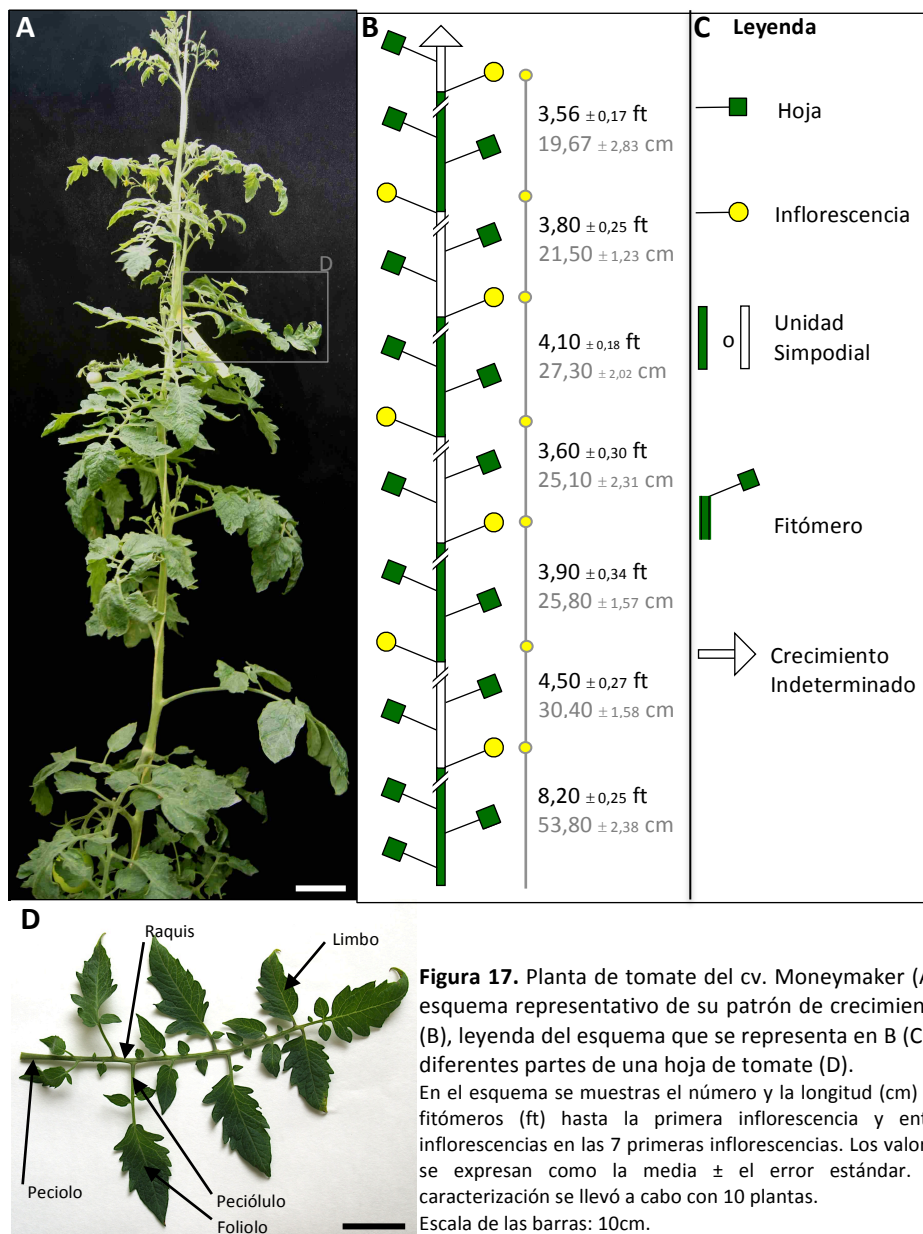
1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL CULTIVAR DE TOMATE “MONEYMAKER”

Para la correcta identificación y posterior caracterización fenotípica de un presunto mutante conviene tener un adecuado conocimiento en torno al desarrollo de los caracteres vegetativos y reproductivos de las plantas de fenotipo silvestre. Por esta razón, a medida que íbamos generando la colección de líneas T-DNA realizamos una caracterización fenotípica de las plantas del cv. Moneymaker (MM) de tomate.

1.1. Caracterización fenotípica del desarrollo vegetativo

El crecimiento simpodial en este cultivar se caracteriza por el desarrollo de aproximadamente 8 hojas antes de que el meristemo apical experimente un cambio de identidad generando una inflorescencia. En este momento, la planta alcanza una altura de unos 50 cm (figura 17). El crecimiento subsiguiente se produce a partir del desarrollo de la yema axilar de la última hoja, a partir de la cual se forma un tallo secundario que crece como una prolongación del tallo primario, desplazando lateralmente a la inflorescencia. Los siguientes segmentos del tallo se desarrollan de forma similar, produciendo una inflorescencia cada tres, cuatro o cinco hojas, lo que equivale a 20-30 cm de distancia entre inflorescencias (figura 17B).

La hoja es compuesta e imparipinnada, tiene un foliolo terminal y unos ocho foliolos laterales que a su vez son compuestos (figura 17C). Los foliolos, lobulados y con los bordes dentados, se unen al eje central, denominado raquis, a través de los peciólulos (nombre que reciben los pecíolos que sostienen cada uno de los folíolos de los que se compone una hoja compuesta). Las hojas se insertan sobre los diversos nudos de forma alterna.



1.2. Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo

Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racimoso, en las que se pueden observar los diferentes estadios del desarrollo floral (figura 18). Este cultivar desarrolla de 8 a 15 flores por inflorescencia, siendo la tercera, cuarta y quinta inflorescencia las que más flores generan (tabla 5). En las 7 primeras inflorescencias, las plantas del cultivar Moneymaker tienen por término medio unas 75 flores, es decir, casi 11 flores por inflorescencia (tabla 5).



Figura 18.
Flor en antesis e inflorescencia de una planta de tomate del cv. Moneymaker.
Escala de la barra: 1cm.

Tabla 5. Pistilo (A), ovario (B) y corte transversal del ovario (C) de una flor en antesis de tomate (cv. Moneymaker).

Planta	Nº de Flores	Nº de Flores / Inflorescencia	Nº de Frutos	Nº de Frutos / Inflorescencia	Tasa de Cuajado (%)
1	74	10,6 ± 1,4	35	5,0 ± 1,3	47 ± 6
2	74	10,6 ± 1,7	26	3,7 ± 1,0	35 ± 6
3	62	8,9 ± 1,3	19	2,7 ± 0,6	31 ± 6
4	71	10,1 ± 1,8	29	4,1 ± 0,6	41 ± 6
5	85	12,1 ± 1,7	24	3,4 ± 1,0	28 ± 5
6	56	8,0 ± 0,2	21	3,0 ± 0,8	38 ± 6
7	63	9,0 ± 1,0	28	4,0 ± 1,2	44 ± 6
8	60	10,0 ± 1,2	30	5,0 ± 1,4	50 ± 6
9	107	15,3 ± 2,6	37	5,3 ± 1,7	35 ± 5
10	94	13,4 ± 2,3	34	4,9 ± 1,0	36 ± 5
Promedio	74,6 ± 5,2	10,8 ± 0,7	28,3 ± 1,9	4,1 ± 0,3	38 ± 2

Las medias se expresan como el promedio ± el error estándar.

En estadio de antesis, el ovario de las flores del cultivar Moneymaker (figura 19) tiene un diámetro de 1,9 cm (tabla 6) y suele constar de dos carpelos (figura 19C), aunque en ocasiones se pueden apreciar ovarios con tres o cuatro carpelos (tabla 6).

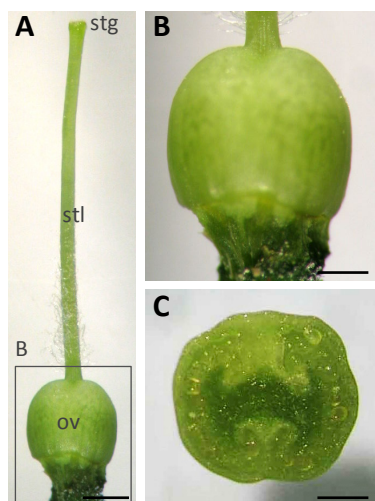


Tabla 6. Características del ovario de Moneymaker en el estadio de antesis en dos cosechas diferentes.

	Diámetro (mm)	Nº de Carpelos
Cosecha 1	1,89 ± 0,04 ^a	2,1 ± 0,1 (2-3) ^a
Cosecha 2	1,87 ± 0,06 ^a	2,4 ± 0,2 (2-4) ^a

Los valores se expresan como la media ± el error estándar. El rango se indica entre paréntesis. Cada caracterización se llevó a cabo con 10 flores.

Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Student).

Figura 19. Pistilo (A), ovario (B) y corte transversal del ovario (C) de una flor en antesis de tomate (cv. Moneymaker).

ov= ovario; stg= estigma; stl= estilo.

Escala de las barras: A: 1mm; B y C: 500μm.

El fruto de Moneymaker es básicamente redondeado y exhibe, en estado maduro, un brillante color rojo cadmio (figura 20). En general, presenta dos lóculos, aunque en ocasiones se pueden encontrar frutos de tres o cuatro lóculos. Por lo que



Figura 20. Frutos de tomate (cv. Moneymaker) en diversos estadios de desarrollo: verde maduro, pintón, rosa y rojo maduro.

Escala de la barra: 1cm.

respecta al tamaño, los frutos caracterizados en nuestros invernaderos tienen un peso medio que ronda los 50 g (tabla 7). Este cultivar se caracteriza por su enorme uniformidad tanto en lo que respecta a la morfología del fruto como en lo que se

refiere al proceso de maduración. En este sentido, al contrario de lo que ocurre con los frutos de otros cultivares, cuyos hombros presentan un color verde más intenso durante el proceso de maduración, el color del fruto de Moneymaker pasa gradualmente de un verde claro a un rojo intenso, sin presentar zonas heterogéneas de color (figura 20).

Tabla 7. Caracteres relacionados con el fruto de Moneymaker en dos cosechas diferentes.

Caracteres		Cosecha 1		Cosecha 2	
	Peso (g)	51,8 ±3,6 ^a	(21,2-107,5)	57,8 ±5,3 ^a	(20,2-104,2)
Calibre del fruto	Altura (cm)	3,8 ±0,1 ^a	(2,9-5)	3,9 ±0,1 ^a	(2,8-4,9)
	Diámetro 1 (cm)	4,8 ±0,1 ^a	(3,8-6,2)	4,9 ±0,2 ^a	(3,7-6,4)
	Diámetro 2 (cm)	4,5 ±0,1 ^a	(3,6-5,9)	4,7 ±0,2 ^a	(3,5-6)
Forma del fruto	IFL	0,81 ±0,01 ^a	(0,7-1)	0,80 ±0,02 ^a	(0,63-0,93)
	IFT	0,95 ±0,01 ^a	(0,87-1)	0,95 ±0,01 ^a	(0,88-1,14)
Interior del Fruto	Nº de Lóculos	2,2 ±0,1 ^a	(2-3)	2,2 ±0,1 ^a	(2-4)
	Nº de Semillas	25 ±4 ^a	(1-75)	39 ±7 ^a	(0-134)
	Pericarpio (cm)	0,74 ±0,02 ^a	(0,5-1)	0,60 ±0,03 ^a	(0,4-0,8)
	IAP	0,16 ±0,00 ^a	(0,13-0,21)	0,12 ±0,00 ^a	(0,10-0,16)

Los valores se expresan como la media ± el error estándar. El rango se indica entre paréntesis. La caracterización se llevó a cabo con 31 y 23 frutos (peso >20g) para las cosechas 1 y 2 respectivamente. Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student).

Diámetro 1= diámetro mayor, Diámetro 2= diámetro perpendicular al diámetro 1, IFL= Índice de forma longitudinal, IFT= Índice de forma transversal, Pericarpio= Anchura del pericarpio, IAP= Índice de anchura del pericarpio.

En relación con la morfología, los frutos son esféricos, aunque ligeramente achatados, tienen una altura de unos 4 cm y un diámetro de 4,5-5 cm. La sección transversal del fruto es casi circular. Con el fin de caracterizar los frutos de los presuntos mutantes, hemos calculado dos índices que permiten hacerse una idea general de la morfología que tiene el fruto. Por un lado, lo que hemos denominado índice de forma longitudinal (IFL), que resulta de dividir la altura del fruto por el diámetro mayor; y por otro, el índice de forma transversal (IFT), que resulta de dividir el diámetro de menor valor por el diámetro de mayor valor (ver figura 15 en el apartado de “Material y Métodos”). En el caso de los frutos de Moneymaker, el valor

del índice de forma longitudinal (IFL) está en torno a 0,8 lo que indica que se trata de frutos básicamente esféricos, aunque ligeramente achatados, mientras que el valor del índice de forma transversal (IFT) es cercano a la unidad, lo que indica que su forma transversal es prácticamente circular.

El grosor del pericarpio de los frutos del cultivar Moneymaker es de 0,6-0,7 cm. Teniendo en cuenta que el grosor del pericarpio varía dependiendo del tamaño del fruto (a menor tamaño, menor grosor), decidimos calcular el índice de anchura del pericarpio (IAP), que resulta de dividir el grosor del pericarpio por el diámetro mayor del fruto. Este índice permite realizar comparaciones entre dos líneas que producen frutos de diferente calibre.

Respecto a la fertilidad, hemos visto que los frutos que se desarrollan en nuestros invernaderos suelen tener unas 30 o 40 semillas.

Conviene indicar por último que, en nuestras condiciones de cultivo, las plantas de Moneymaker vienen a desarrollar en torno a 4 frutos por inflorescencia, lo que indica que la tasa media de cuajado es del 38% (tabla 5).

1.3. Respuesta al ensayo histoquímico GUS

La expresión del gen *UidA* (GUS) viene utilizándose en Biología Vegetal desde hace varias décadas. El gen *UidA* de la bacteria *Escherichia coli* codifica la enzima β -glucuronidasa, que tiene como sustrato varios tipos de glucurónidos, aunque el más comúnmente utilizado es el X-Gluc o *5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucuronido*. En presencia de una solución tamponada de X-Gluc, los tejidos en los que se expresa el gen se tiñen de color azul (Jefferson *et al.*, 1986; Jefferson, 1987; Jefferson *et al.*, 1987). Teniendo en cuenta que la tinción GUS se puede visualizar fácilmente en el laboratorio, el gen *UidA* se ha utilizado ampliamente para estudiar la actividad de un promotor y poder analizar los patrones de expresión del gen que regula.

De manera alternativa, los programas de mutagénesis insercional suelen estar basados en el empleo de vectores convencionales, pero el uso de 'trampas génicas' puede proporcionar resultados más eficientes (Springer, 2000). Cada trampa

(intensificadores, promotores o genes) está diseñada con un propósito, pero en cualquier caso la ventaja estriba en su naturaleza dual: como cualquier otro T-DNA, las trampas generan mutaciones de inserción, pero además, si se insertan en la orientación correcta, el gen delator queda bajo control de los elementos de regulación del gen endógeno. De esta forma, no sólo se puede inferir la función del gen a través de la caracterización fenotípica del mutante, sino que, analizando la expresión del delator, se obtiene el patrón de expresión espacio-temporal del gen etiquetado.

Evidentemente, el ensayo GUS es útil si el organismo en cuestión no posee una actividad β -glucuronidasa, o si la actividad de fondo es muy débil. Por ejemplo, según Jefferson (1993), no son aptos para la tinción GUS ni los vertebrados ni los moluscos, pero sí las plantas superiores, los musgos, las algas, los helechos, los hongos y la mayoría de las bacterias.

No obstante, y en lo que respecta a las plantas superiores, diversos autores han observado actividad GUS en algunos tejidos. Así, Hu *et al.* (1990) tras analizar estructuras vegetativas y reproductivas de 52 especies vegetales diferentes, observaron la existencia de actividad intrínseca tipo GUS en frutos y semillas de la mayoría de estas especies. Hodal *et al.* (1992), Wozniak y Owens (1994), Hänsch *et al.* (1995) y Thomasset *et al.* (1996) también detectaron este tipo de actividad en plantas, sugiriendo que se debía a la presencia de una proteína endógena GUS, aunque añadían que ésta dejaba de ser activa a un pH de 7.0. Kosugi *et al.* (1990) solventaron la aparición de falsos positivos en anteras de las flores de tabaco, judía y arroz añadiendo metanol como solvente orgánico a la solución tamponada de X-Gluc. De hecho, nosotros en el laboratorio adoptamos satisfactoriamente esta estrategia tras observar la aparición de falsos positivos en las anteras de las flores del cultivar p73 de tomate (Angarita, 2009).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, quisimos analizar la posible existencia de falsos positivos en diferentes tejidos vegetativos y reproductivos de plantas de tomate Moneymaker utilizando el protocolo que empleamos en nuestro laboratorio (incubación de los tejidos a 37°C durante 24h en X-Gluc a pH 7.0 con suplemento de metanol al 20%).

Pudimos comprobar que no se detectaba actividad GUS ni en tejidos vegetativos ni en flores en diferentes estadios de desarrollo.

En fruto, no se detectó actividad GUS desde el cuajado hasta un estadio de verde inmaduro de unos 2 cm de diámetro (figura 21A, B, E y F), es decir, aproximadamente hasta 17-18 días post-antesis, una vez finalizada la fase de multiplicación celular y recién iniciada la fase de expansión celular en los tejidos del fruto (Giovannoni, 2004).

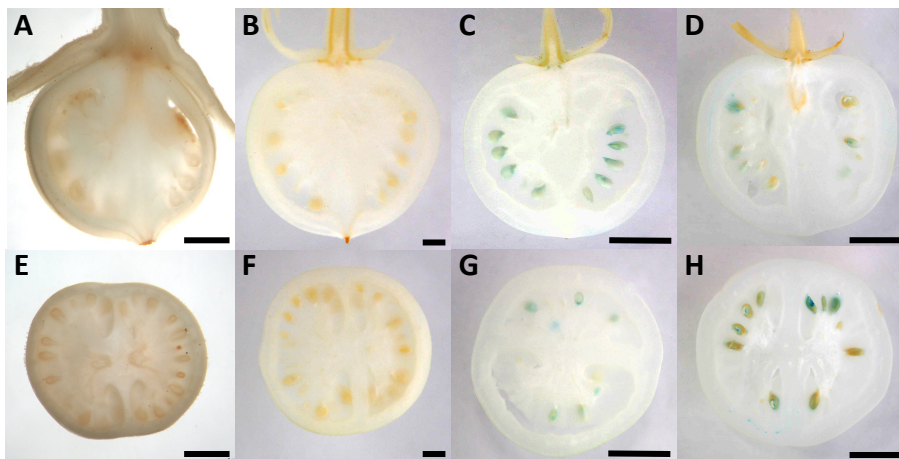


Figura 21. Actividad GUS en frutos de Moneymaker en estadio de verde inmaduro de 0,8cm (A y E), 1,8cm (B y F), 2,7cm (C y G) y 3,5cm (D y H). A-D: cortes longitudinales; E-H: cortes transversales. Escala de las barras: A, B, E y F: 2mm; C, D, G y H: 1cm.

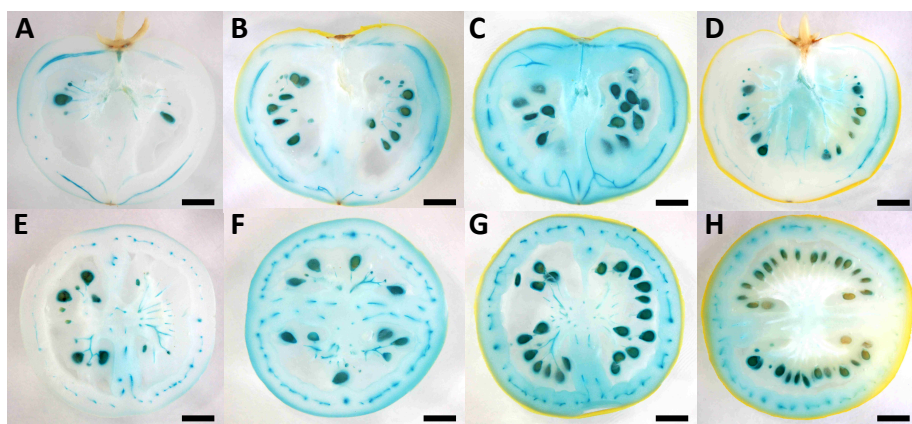


Figura 22. Actividad GUS en frutos de Moneymaker en estadio de verde maduro (A y E), pintón (B y F), rosa (C y G) y rojo maduro (D y H). A-D: cortes longitudinales; E-H: cortes transversales. Escala de las barras: 1cm.

Sin embargo, se empezó a detectar actividad GUS en frutos en estadio de verde inmaduro de aproximadamente 2,5 cm de diámetro. En estos frutos, la actividad se hizo visible sólo en las semillas en desarrollo y la intensidad de color azul era leve (figura 21C y G). A medida que el fruto crecía y alcanzaba mayor calibre, el grado de tinción en las semillas en desarrollo se hizo más intenso (figura 21D y H).

En estadio de fruto verde maduro la actividad GUS se visualizó perfectamente tanto en las semillas como en funículo y haces vasculares de la columela, placenta y pericarpio (figura 22A y E). En los estadios pintón y rosa, esta tinción se extendió a casi todos los tejidos del fruto (figura 22B, C, F y G), con la notable excepción de la cutícula. Finalmente, en estadio rojo maduro, el fruto parecía perder un poco de intensidad azul, aunque seguía siendo intensa en semillas y el sistema vascular (figura 22D y H). Conviene indicar que también se detectó cierta actividad GUS en la zona de abscisión del pedicelo del fruto en los estadios pintón, rosa y rojo maduro (figura 23).

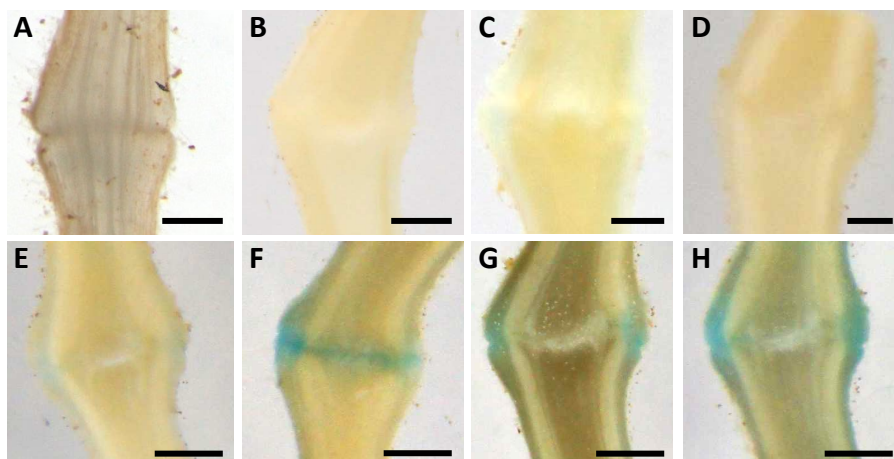


Figura 23. Actividad GUS en la zona de abscisión del pedicelo de fruto de Moneymaker en los estadios verde inmaduro de 0,8cm (A), de 1,8cm (B), de 2,7cm (C) y de 3,5cm (D), así como en los estadios verde maduro (E), pintón (F), rosa (G) y rojo maduro (H).

Escala de las barras: A: 500 μ m; B-D: 1mm; E-H: 2mm.

En definitiva, los resultados obtenidos indican que se debe tener una cierta cautela a la hora de interpretar los patrones de expresión del delator en frutos de los presuntos mutantes.

2. GENERACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE LÍNEAS T-DNA DE TOMATE (CV. MONEYMAKER) E IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES DOMINANTES CON ALTERACIONES EN CARACTERES DEL DESARROLLO

2.1. Generación de una colección de líneas T-DNA de tomate

La integración de un T-DNA dentro de la secuencia estructural o de los elementos de regulación de un gen endógeno puede ocasionar la disrupción y la subsiguiente anulación o alteración de su función original. De forma alternativa, la integración del T-DNA corriente arriba o abajo del gen puede modificar su nivel de expresión debido a la interferencia entre los elementos de regulación de los genes presentes en el T-DNA y los elementos de regulación del gen endógeno.

De esta manera, tras la detección de los efectos que produce la anulación de función del gen o un cambio en su nivel de expresión en las plantas TG1 (mutaciones con efectos dominantes, semidominantes o aditivos) o en las progenies TG2 (mutaciones con efectos recesivos), como el gen está etiquetado por el T-DNA, se puede abordar la clonación del mismo mediante técnicas basadas en la PCR (Anchor-PCR o TAIL-PCR). Este método de generación de mutantes ha llegado a convertirse en una herramienta esencial en el campo de la genómica funcional.

Una aproximación mucho más potente se basa en el empleo de trampas génicas (Springer, 2000). Como se ha comentado antes, el interés de esta estrategia reside en la naturaleza dual de las trampas, ya que por un lado generan mutaciones de inserción y por otro permiten estudiar el patrón de expresión del gen etiquetado. De esta forma, no sólo se pueden hacer inferencias en torno a la función del gen etiquetado en un determinado mutante de inserción a través del fenotipado en TG1 o TG2, sino que también se puede obtener un panorama bastante preciso del patrón de expresión espacio-temporal de dicho gen, ya que, por el peculiar diseño de las trampas, la expresión del gen delator mimetiza la expresión del gen endógeno etiquetado.

Un punto crucial de esta estrategia radica en la necesidad de obtener un elevado número de líneas para que haya una cierta probabilidad de obtener mutantes. Para

ello, es preciso disponer de un método eficaz de transformación. Por fortuna, en nuestro laboratorio disponemos de un método de transformación de tomate vía *Agrobacterium tumefaciens* que nos proporciona una *eficacia útil* del 20-25%, lo que supone obtener 20-25 plantas transgénicas diploides independientes (es decir, procedentes de eventos independientes de transformación) por cada 100 explantes inoculados. Empleando este método de transformación, nuestro grupo decidió iniciar hace ya algunos años un programa de genómica funcional en tomate basado en la mutagénesis insercional con T-DNA. Teniendo en cuenta las ventajas que proporciona el empleo de trampas génicas, solicitamos al Dr. Jack (Department of Biological Sciences; Dartmouth College, USA) una trampa de intensificadores (vector pD991) que su grupo estaba empleando en *Arabidopsis* (Campisi *et al.*, 1999). El Dr. Jack nos cedió amablemente el vector y, a partir de ese momento, el grupo comenzó a generar líneas de T-DNA con la trampa de intensificadores.

De hecho, el programa de mutagénesis insercional se está llevando a cabo no sólo con tomate, sino también con varias especies silvestres relacionadas en el contexto de una colaboración con los grupos del Dr. Rafael Lozano (Universidad de Almería) y de la Dra. M^a Carmen Bolarín (CEBAS, Murcia). El objetivo es identificar mutantes alterados en procesos del desarrollo vegetativo y reproductivo, así como en dos tipos de estrés abiótico (salinidad y estrés hídrico).

Cuando se inició este proyecto de investigación, en nuestro laboratorio ya se habían generado en torno a 2000 líneas de T-DNA de tomate, 1000 de ellas con el cv. p73 (Angarita, 2009) y las otras 1000 con el cv. Moneymaker. En este marco general, el primer objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido ampliar la colección de líneas de T-DNA de tomate a fin de seguir profundizando en la disección genética de caracteres relevantes a nivel agronómico.

En la tabla 8 se puede ver el número total de líneas T-DNA que se han obtenido en el ámbito de esta Tesis Doctoral. En concreto, se realizaron 5 transformaciones genéticas en las que se emplearon un total de 4.462 explantes de cotiledón. Finalmente se obtuvieron 1.220 plantas, de las cuales, tras analizarlas mediante citometría de flujo, 974 resultaron ser diploides, lo que supone una tasa útil de

transformación del 21,83% (tabla 8). La expresión del gen marcador *nptII* en las plantas transgénicas se verificó mediante un test de enraizamiento en medio selectivo (medio de enraizamiento suplementado con 100 mg/l de kanamicina).

Tabla 8. Número de plantas transgénicas de tomate (cv. MoneyMaker) obtenidas con el vector pD991.

Nº explantes transformados	4462
Nº plantas transgénicas (TG1) diploides	974
Eficacia útil de transformación	21,83%

El mantenimiento de esta colección de plantas transgénicas y la obtención de réplicas para su transferencia a invernadero se ha llevado a cabo mediante propagación clonal *in vitro* (figura 24A). El cultivo de las plantas transgénicas en el invernadero (figura 24B) ha hecho factible la detección de mutantes en TG1 (mutaciones con efectos dominantes, semidominantes o aditivos), así como la obtención de las progenies TG2, lo que permitirá identificar mutaciones con efectos recesivos. Por lo que respecta a la detección de mutantes con efectos recesivos, debido a nuestra escasa disponibilidad de espacio de invernadero, las progenies TG2 de todas las líneas T-DNA (salvo, claro está, aquellas que exhiben problemas de infertilidad), se envía a uno de los dos grupos con los que colaboramos en este proyecto (en concreto, el grupo del Dr. Lozano de la Universidad de Almería) para que puedan realizar el fenotipado en sus invernaderos.



Figura 24. Cultivo de las plantas transgénicas en la cámara de nuestro laboratorio (mantenimiento de la colección) y en el invernadero (evaluación fenotípica y caracterización).

En el contexto de esta Tesis nos hemos centrado en la evaluación de plantas TG1 para la detección de mutaciones con efectos dominantes, semidominantes o aditivos. En el siguiente apartado se muestran algunos mutantes relevantes que se han detectado.

2.2. Detección de mutantes con efectos dominantes

Como se comentaba en el apartado anterior, se cultivaron las 974 plantas transgénicas de tomate (TG1) con un doble objetivo: i) obtener la progenie TG2 a fin de identificar mutaciones con efectos recesivos y ii) llevar a cabo el escrutinio preliminar de la colección con el fin de detectar mutaciones con efectos dominantes, semidominantes o aditivos. Por lo que respecta a las alteraciones detectadas en las plantas transgénicas, y en consonancia con lo que se ha visto previamente en nuestro laboratorio (Angarita, 2009), un elevado número de fenotipos estuvieron relacionados con esterilidad o baja fertilidad. En este sentido, casi un 10% de las plantas transgénicas no generaron descendencia o muy poca semilla TG2, como consecuencia de un escaso porcentaje de cuajado, ausencia de frutos o desarrollo de frutos sin semilla.

Por otro lado, conviene indicar que los fenotipos más frecuentes estaban relacionados con alteraciones en caracteres del desarrollo vegetativo, como tamaño de la planta (e.g. compacidad o menor tamaño) o aspectos relacionados con el desarrollo foliar (e.g. morfología o color de la hoja). También conviene señalar que una buena parte de los mutantes detectados exhibieron efectos pleiotrópicos, es decir, tenían alterado más de un carácter. De hecho, la mayor parte de mutaciones con efectos pleiotrópicos generaban alteraciones en caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo y reproductivo. Con todo, también se identificaron algunos mutantes que sólo tenían alterado el desarrollo vegetativo o, alternativamente, solo en el desarrollo reproductivo.

Por lo que respecta a este último, han sido más frecuentes los mutantes afectados en el desarrollo del fruto que los que exhibieron alteraciones en el desarrollo floral.

RESULTADOS COLECCIÓN T-DNA Y MUTANTES

Los resultados del cribado de esta colección de líneas T-DNA indican que en torno al 15% de las plantas transgénicas exhibe algún tipo de alteración distintiva. En la figura 25 se puede ver una valoración preliminar de las alteraciones observadas en el desarrollo (vegetativo y/o reproductivo) de esas plantas.

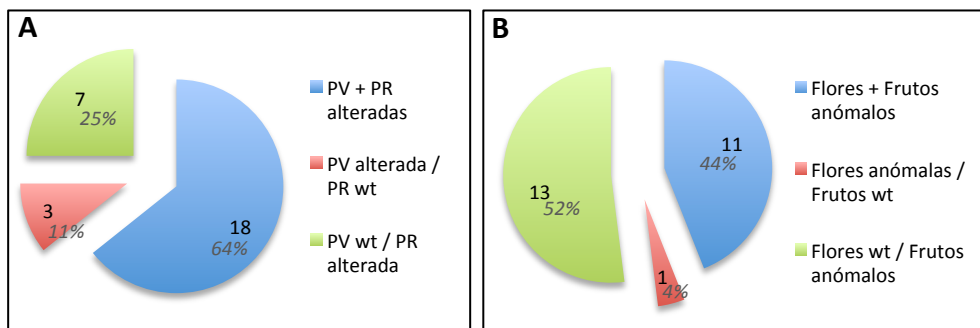


Figura 25. Tipos de alteraciones del desarrollo en los 28 mutantes identificados en la colección de líneas T-DNA (plantas TG1) con la trampa de intensificadores. A: Mutantes T-DNA alterados sólo en el desarrollo de la parte vegetativa (PV), sólo en la parte reproductiva (PR), o tanto en la parte vegetativa como reproductiva (PV + PR). B: Mutantes T-DNA de desarrollo reproductivo alterados sólo en flores, sólo en frutos, o en los dos tipos de órganos. Los genotipos cuyas flores, WT o no, no dieron lugar a ningún fruto, se contabilizaron en la categoría “Flores + Frutos anómalos”.

Los números de mutantes en cada categoría se indican en caracteres negros, mientras que el porcentaje correspondiente en cursiva y de color gris.

PR= parte reproductiva; PV= parte vegetativa; wt= wild-type.

A continuación se describen algunos de los mutantes que se han detectado en la colección de líneas T-DNA.

2.2.1. Descripción de algunos mutantes con alteraciones en el desarrollo vegetativo

Tom1252

Como ya se ha comentado, muchos de los mutantes detectados estaban relacionados con el tamaño de la planta. *Tom1252* es un ejemplo de este tipo. Tras 4-5 meses de cultivo, la altura del mutante era significativamente menor que la que suele alcanzar el WT. En concreto, durante este periodo de cultivo el mutante no superó los

60 cm de altura, mientras que el WT alcanza normalmente unos 2-2,5 m (figura 26A). Tanto las hojas como los folíolos del mutante eran de menor tamaño que los del WT, aunque la morfología, tanto de la hoja como de los folíolos, era similar (figura 26B vs 26C). Otro aspecto distintivo del mutante era la textura de las hojas, más cerasas y brillantes que las del WT (figura 26B vs 26C).

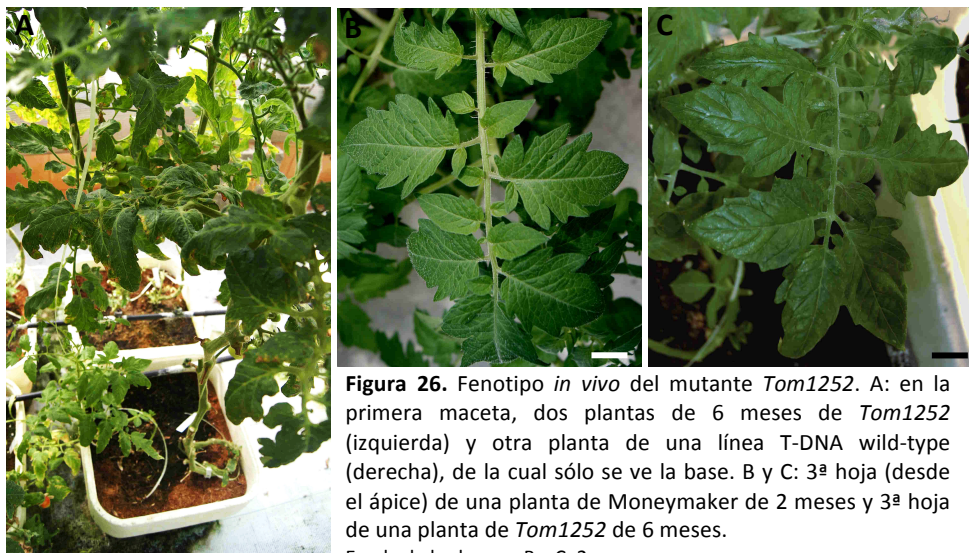


Figura 26. Fenotipo *in vivo* del mutante *Tom1252*. A: en la primera maceta, dos plantas de 6 meses de *Tom1252* (izquierda) y otra planta de una línea T-DNA wild-type (derecha), de la cual sólo se ve la base. B y C: 3ª hoja (desde el ápice) de una planta de MoneyMaker de 2 meses y 3ª hoja de una planta de *Tom1252* de 6 meses. Escala de las barras: B y C: 2cm.

Por lo que respecta al desarrollo reproductivo de este mutante, debido a su lento crecimiento sólo se desarrollaron dos inflorescencias que tenían menos flores que las del WT. Las flores, sin embargo, no exhibían alteraciones y en algunas de ellas se desarrollaron frutos con semilla.

Tom57

Tom57 es otro de los fenotipos característicos entre los mutantes con alteraciones relacionadas con el tamaño de la planta, muy parecido en algunos aspectos a *Tom1252*, ya que se trata de un mutante que exhibe un porte mucho más débil y un lento crecimiento en condiciones de invernadero. El mutante se detectó en estadios muy tempranos de su desarrollo como ilustra la figura 27A, en la que se puede ver una planta WT y el mutante tras 45 días de cultivo en el invernadero. Las alteraciones en el

RESULTADOS COLECCIÓN T-DNA Y MUTANTES

desarrollo de la hoja son más severas que las que se observaban en *Tom1252*. En este caso, los folíolos tenían menor grado de disección que los del WT y se encontraban enrollados hacia el haz (figura 27C vs 27D), carácter que se intensificaba en hojas completamente desarrolladas o más adultas (figura 27E). Además, las hojas exhibían un tono verde más pálido.

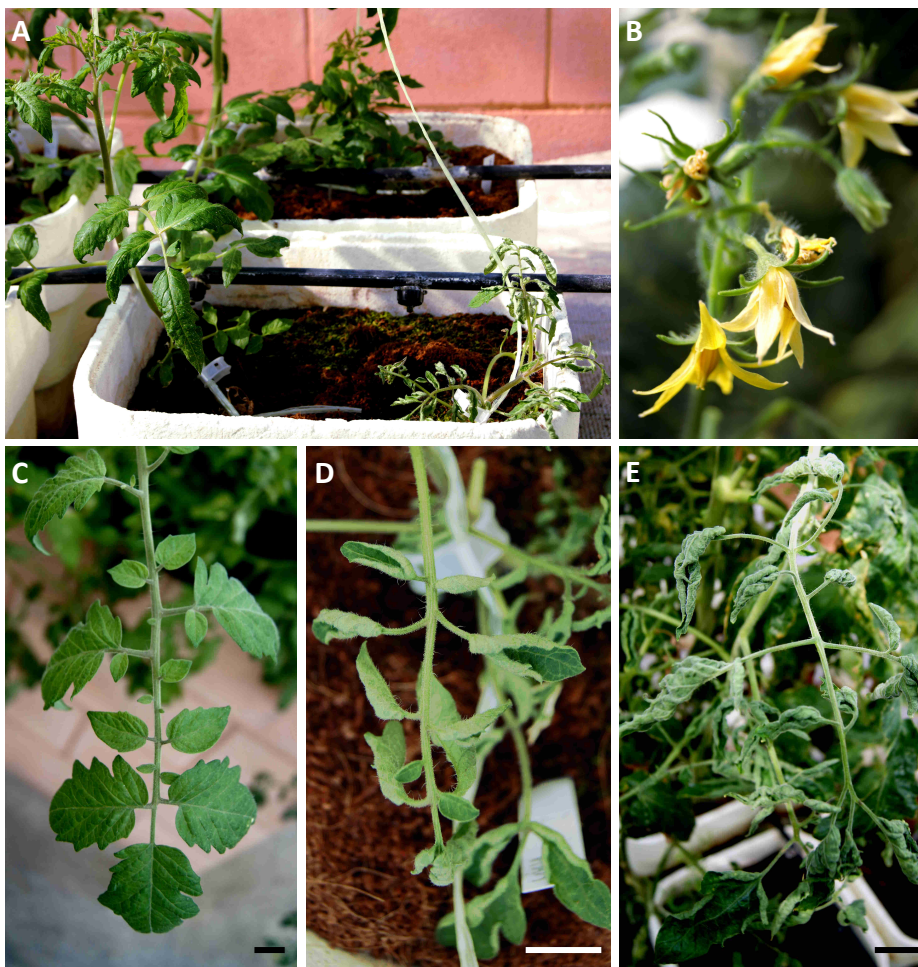


Figura 27. Fenotipo *in vivo* del mutante *Tom57*. A: en la primera maceta, una planta de 1,5 meses de *Tom57* (derecha) y otra planta de una línea T-DNA de porte wild-type (izquierda). B: inflorescencia del mutante. C: hoja de una planta de Moneymaker de 1,5 meses. D y E: hoja de una planta de *Tom57* de 1,5 meses (D) y de una planta adulta (E). Escala de las barras: C: 2cm; D: 1cm; E: 4cm.

En relación con el desarrollo reproductivo, al igual que ocurría con otros mutantes que eran de menor tamaño (i.e. *Tom1252*), debido a su lento crecimiento sólo se desarrollaron dos o tres inflorescencias. Aunque no se detectaron alteraciones en el número de flores por inflorescencia o en la morfología de la flor (figura 27B), en el mutante no cuajó ningún fruto.

Tom209

Tom209 era uno de los mutantes con cambios en caracteres diversos, es decir la alteración del gen tenía efectos pleiotrópicos. Por lo que respecta al desarrollo vegetativo, el mutante exhibía un porte más débil y la morfología de sus hojas era distinta a la de las hojas del WT, con folíolos más delgados y retorcidos (figuras 28A vs 28B). El ritmo de crecimiento era similar al del WT, lo que nos permitió observar las alteraciones que el mutante manifestó en diferentes caracteres del desarrollo reproductivo. Algunas inflorescencias (especialmente las primeras) eran muy pequeñas (i.e. micro-inflorescencias) o tenían pocas flores que terminaban degenerando (figuras 28D y 28E). En otras, se desarrollaban pocas flores por inflorescencia (i.e. 3-4 flores) y, además, a lo largo del eje principal de la inflorescencia aparecían hojas (figura 28C). Otras inflorescencias exhibían, sin embargo, un aspecto más normal, ya que las flores eran similares a las del WT en cuanto al tamaño y llegaban a desarrollar frutos (figura 28F). Como se puede ver en las figuras 28F y 28H, los frutos eran, en general, de pequeño calibre, de morfología cordiforme y carecían de semilla.

A pesar de las severas alteraciones fenotípicas observadas en el desarrollo vegetativo, el análisis de la expresión del gen delator *UidA* reveló la ausencia de tinción GUS en la mayor parte de las estructuras vegetativas, salvo en las yemas axilares y en haces vasculares de secciones transversales de raquis de hoja, en las que, en ocasiones, se detectaron tonalidades azules (figura 29A). En cambio, sí se detectó expresión del delator en diferentes tejidos u órganos reproductivos. En anteras se detectó tinción GUS en todos los estadios del desarrollo floral evaluados, desde el estadio de botón floral 1 hasta la antesis (figuras 29D y 29E). También se detectó

RESULTADOS COLECCIÓN T-DNA Y MUTANTES

tinción GUS en la zona de unión del ovario con el pedicelo, siendo la tinción más intensa en estadios más avanzados del desarrollo floral (figuras 29F y 29G). Además, se detectó expresión del delator en la zona de abscisión del pedicelo a lo largo de los diferentes estadios del desarrollo de la flor (figuras 29H-29J).



Figura 28. Fenotipo *in vivo* del mutante *Tom209*. A, B: hoja adulta de una planta de MoneyMaker (A) y de una planta de *Tom209* (B). C: detalle de una inflorescencia de *Tom209* el primer año de cultivo. D y E: ejemplos de inflorescencias de *Tom209* en las cosechas siguientes de 5 y 2 flores, respectivamente. F: frutos en forma de peonza de *Tom209*. G y H: interior de un fruto de MoneyMaker y *Tom209*, respectivamente.

Escala de las barras: A y B: 5cm; C: 1cm; D y E: 2mm; G y H: 5mm.

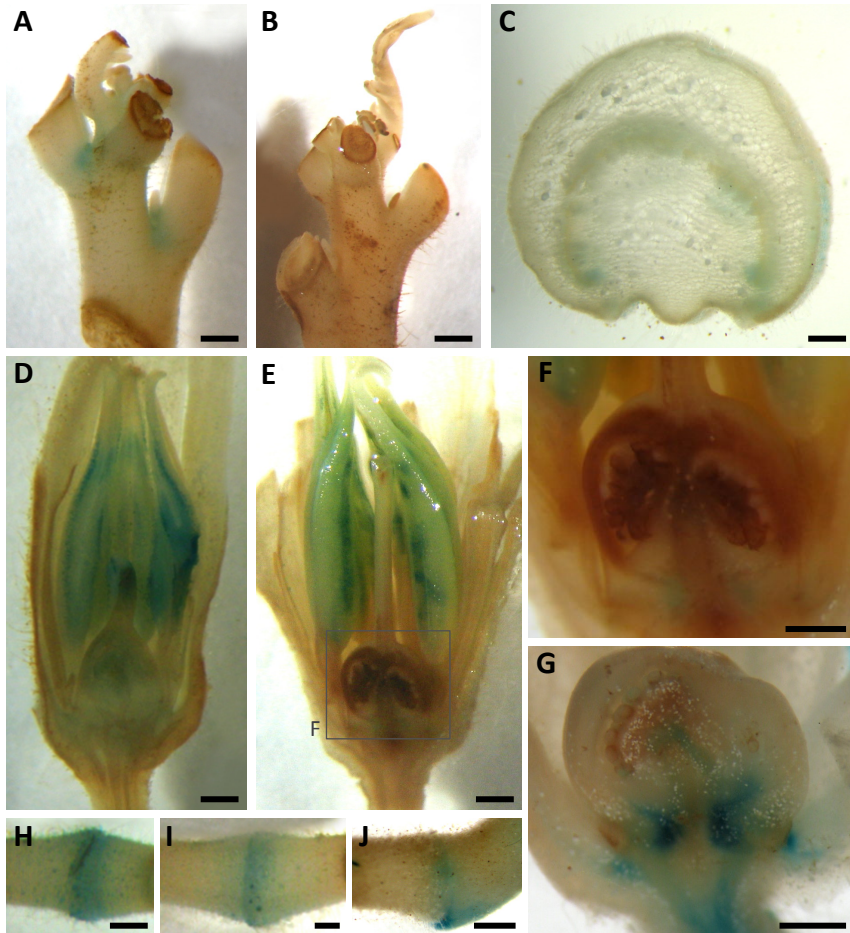


Figura 29. Patrón de expresión GUS en el mutante *Tom209*. A y B: ápices de tallos secundarios de la planta, con y sin expresión GUS en yemas axilares (para facilitar la observación, se eliminaron hojas del ápice). C: corte transversal de raquis de una hoja de *Tom209* con una ligera expresión GUS en vasos conductores y epidermis. D y E: sección transversal de botón floral 1 y de flor en antesis, respectivamente. F: detalle del ovario de (E). G: detalle del ovario de una flor en postantesis (fruto de 0,5cm de diámetro). H-J: zona de abscisión del pedicelo floral de flor en estadio de botón floral (H), antesis (I) y postantesis (J).

Escala de las barras: A-D, F, H, I: 0,5mm; E, G, J: 1mm.

Tom54

Algunos de los mutantes que identificamos exhibieron una pigmentación diferente en las hojas. Uno de los más espectaculares en este sentido fue *Tom54*. Sus hojas eran de similar morfología y tamaño que las del WT pero sus folíolos exhibían una pigmentación verde más pálido (figura 30A). Además, la mayor parte de los folíolos tenían el borde de color blanco (figuras 30B vs 30C). Como consecuencia de tener probablemente afectada la síntesis de clorofila, el mutante exhibía un crecimiento extraordinariamente lento.

Tras 5-6 meses de cultivo en el invernadero, se pudieron observar las primeras inflorescencias, similares a las del WT en cuanto a tamaño y número de flores (figura 30D). Las flores eran idénticas a las del WT aunque de un color más pálido. Además, en los sépalos se observó una variegación similar a la que se observaba en las hojas (figura 30G y 30H).

Por lo que respecta a los frutos, eran de similar morfología y tamaño que los de MoneyMaker pero de pigmentación más pálida en los estadios en los que el fruto era de color verde (figuras 30E vs 30F). A pesar de que en el mutante está afectada la síntesis de clorofila en las hojas, no se observaron diferencias en lo que respecta a la pigmentación del fruto tras la maduración, tal y como se puede ver en las figuras 30E y 30F. Los frutos maduros del mutante desarrollaron semillas de aspecto wild-type (figuras 30I y 30J).

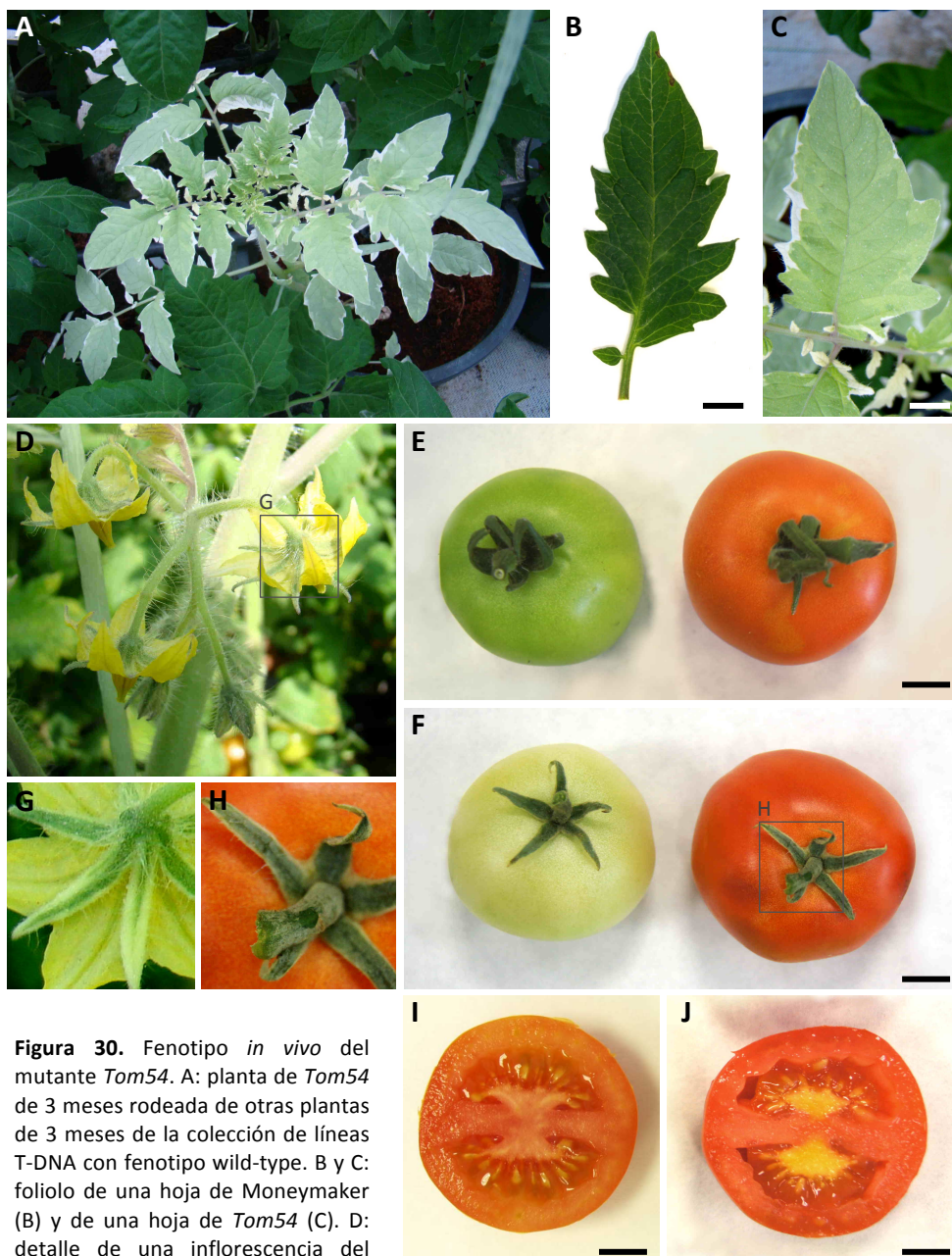


Figura 30. Fenotipo *in vivo* del mutante *Tom54*. A: planta de *Tom54* de 3 meses rodeada de otras plantas de 3 meses de la colección de líneas T-DNA con fenotipo wild-type. B y C: foliolo de una hoja de Moneymaker (B) y de una hoja de *Tom54* (C). D: detalle de una inflorescencia del mutante. E y F: fruto verde maduro (izquierda) y rojo maduro (derecha) de Moneymaker y de *Tom54*, respectivamente. G y H: detalle de los sépalos de una flor y de los sépalos de un fruto rojo de *Tom54*, respectivamente. I y J: interior de un fruto rojo maduro de Moneymaker y de *Tom54*, respectivamente.

Escala de las barras: 1cm.

2.2.2. Descripción de algunos mutantes alterados en el desarrollo de la inflorescencia, la flor o las zonas de abscisión

Tom1819

A pesar de que en este mutante se detectaron algunos cambios en el desarrollo vegetativo, las alteraciones más relevantes se observaron en el desarrollo de la inflorescencia.

Por lo que respecta al desarrollo vegetativo, los folíolos de las hojas del mutante eran más pequeñas y exhibían una cierta clorosis (figuras 31A vs 31B). Como consecuencia probable de estas alteraciones, el mutante exhibía un crecimiento lento respecto al WT. En cualquier caso, aunque con un cierto retraso, las plantas alcanzaron el tamaño de las WT al final de la cosecha.

Como comentábamos anteriormente, las alteraciones más relevantes se observaron en las inflorescencias, en las que se producía un cambio en la identidad del meristemo de inflorescencia. En efecto, en el WT las inflorescencias suelen culminar con el desarrollo de una flor (figura 31C), mientras que en el mutante todas las inflorescencias culminaban con el desarrollo de hojas (figuras 31D y 31E). El número de flores por inflorescencia era similar en el WT y en el mutante, pero no todas las flores del mutante eran idénticas. Aproximadamente la mitad de las flores de cada inflorescencia eran iguales a las del WT, llegando incluso a dar frutos similares en tamaño y morfología a los de Moneymaker (figura 31E), mientras que la otra mitad eran flores de muy pequeño calibre (unos pocos milímetros) que ni siquiera llegaban a abrirse (figuras 31D-31F).

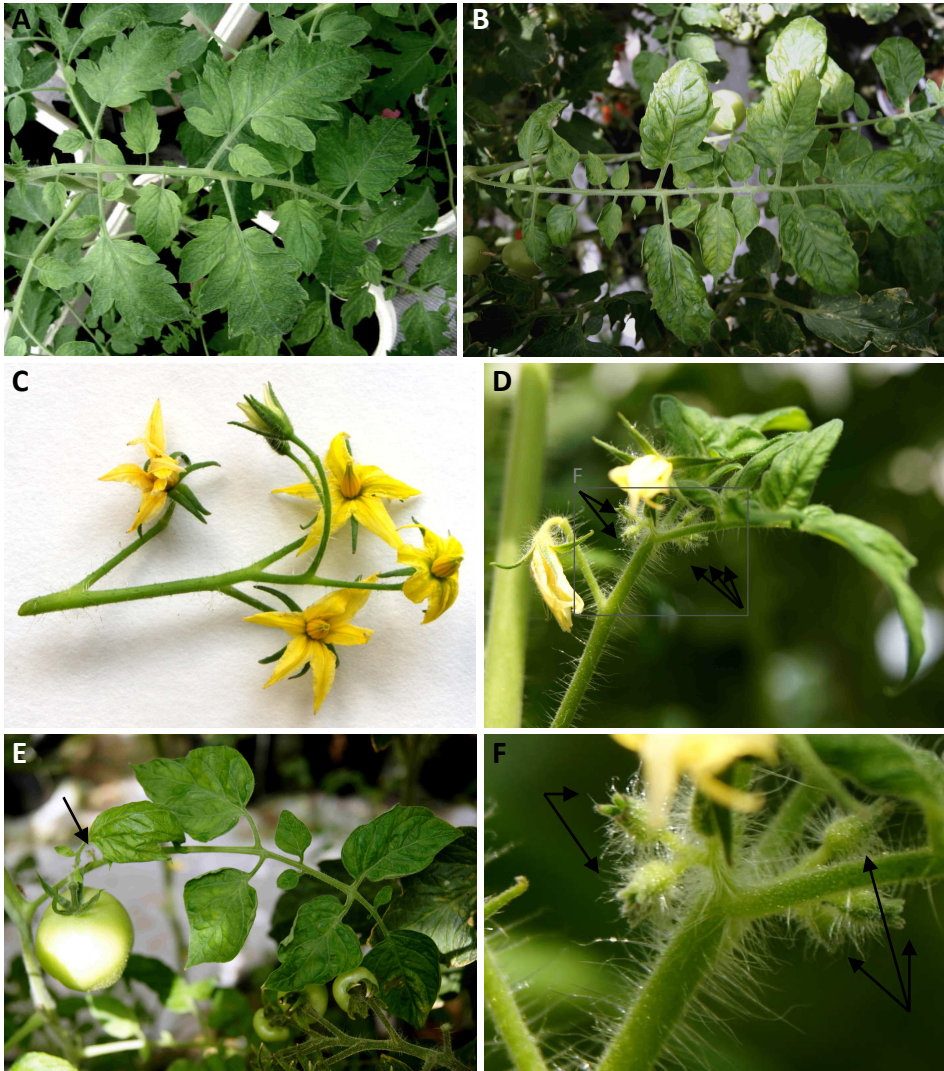


Figura 31. Fenotipo *in vivo* del mutante *Tom1819*. A y B: hoja adulta de Moneymaker (A) y de *Tom1819* (B). C, D y E: inflorescencia de Moneymaker (C) y dos inflorescencias de *Tom1819* con 2 flores en postantesis (D) y con un fruto (E). Las flechas indican las micro-flores anómalas en las inflorescencias del mutante. F: detalle de las micro-flores en (D).

Tom1491

Tom1491 es otro mutante en el que, a pesar de mostrar alteraciones en el desarrollo vegetativo, los cambios más llamativos se producían en las flores.

El mutante exhibía claramente un porte más débil y síntomas prematuros de senescencia (figura 32B). Sus hojas eran de menor calibre, de color verde más claro y exhibían una precoz clorosis (figura 32A).

Sin embargo, lo que más nos llamó la atención en este mutante fue la caída prematura de sus flores, que se desprendían de la inflorescencia por la zona de abscisión del pedicelo antes de que alcanzaran el estadio de antesis (figuras 32C y 32D). Por esta razón, nos resultó imposible no sólo obtener descendencia TG2 sino también realizar cualquier tipo de cruce con Moneymaker.

Pudimos comprobar que el gen delator (*Uida*) no se expresaba en hojas a pesar de las alteraciones que exhibían. En efecto, no se visualizó expresión GUS ni en hoja joven ni en hoja completamente desarrollada. Asimismo, tampoco se visualizó expresión GUS en secciones de tallo de las regiones más jóvenes de la planta (i.e. brotes laterales). Sin embargo, sí que se visualizó expresión GUS en secciones de tallo de zonas más adultas (i.e. tallo principal, figura 33A).

En flores, sólo se pudo analizar la expresión del delator hasta el estadio de preantesis, que era el momento en el que se producía la caída de la flor. En anteras se detectó expresión del delator en los primeros estadios del desarrollo de la flor (i.e. botón floral 1, figura 33B), pero no en estadios más avanzados (i.e. botón floral 2, figuras 33C y 33D). No se detectó expresión del delator en ningún otro verticilo floral en los estadios de desarrollo que se analizaron.

Lo más interesante es que se detectó una intensa expresión GUS en diferentes zonas de abscisión. En efecto, en todos los estadios de desarrollo se detectó expresión GUS en la zona de abscisión del pedicelo, es decir, en la zona por la que se desprendía la flor (figuras 33D-33F). Además, se detectó tinción GUS en la zona de inserción de los verticilos florales, es decir, en lugares en los que en algún momento del desarrollo floral se produce un evento de abscisión (figura 33D). En definitiva, los resultados

parecen indicar que en este mutante la expresión del delator está vinculada a las alteraciones fenotípicas de mayor relevancia, es decir, los procesos de abscisión.



Figura 32. Fenotipo *in vivo* del mutante *Tom1491*. A: hoja adulta de Moneymaker (izquierda) y de *Tom1491* (derecha) (*recuadro*: foliolos de una hoja joven de Moneymaker y *Tom1491*, respectivamente). B: una planta adulta del mutante (con síntomas de senescencia prematura) rodeado de plantas de fenotipo wild-type (verdes). C: inflorescencia de *Tom1491* con flores en diferentes estadios de desarrollo que muestran síntomas más o menos pronunciados de senescencia (*recuadro*: detalle del pedicelo floral, cuya zona de abscisión se señala por una flecha). D: detalle de una inflorescencia tras la senescencia y caída de las flores.

Escala de las barras en A: 5cm, 2cm y 4cm, respectivamente.

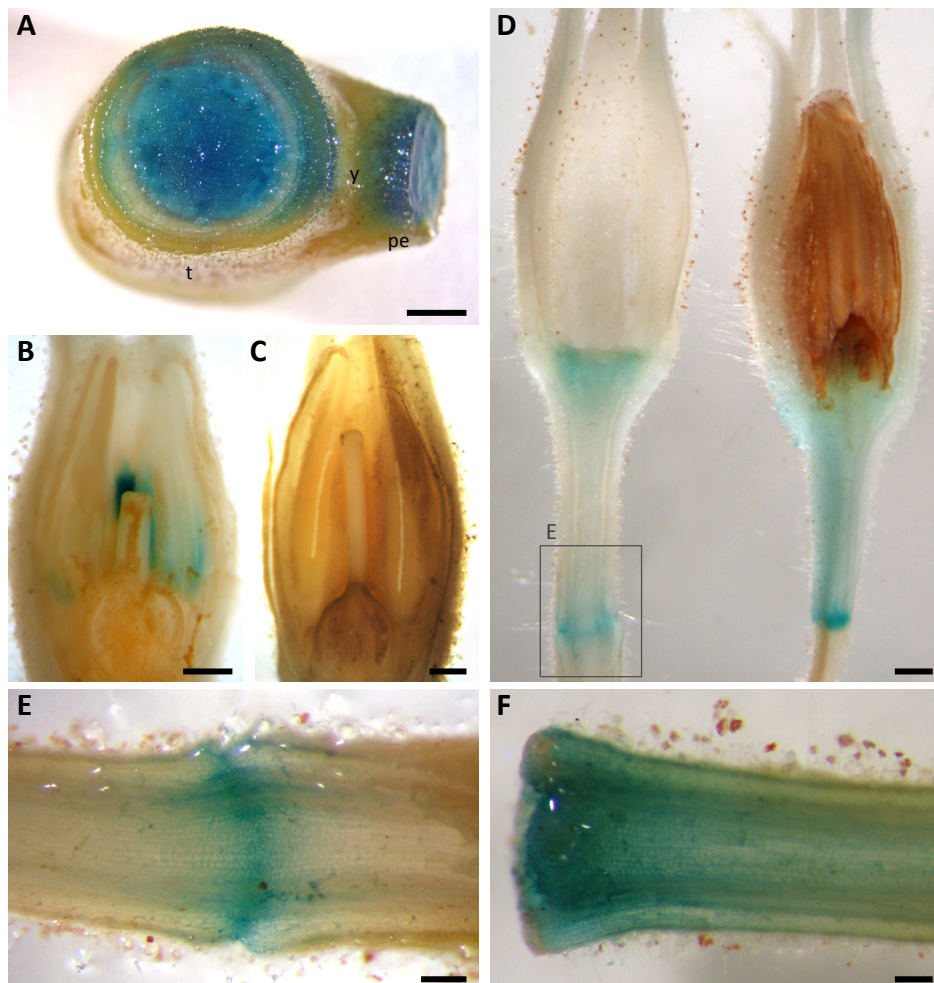


Figura 33. Patrón de expresión GUS en el mutante *Tom1491*. A: Vista en planta de un nudo de tallo seccionado transversalmente, en el cual el peciolo de la hoja también ha sido seccionado transversalmente. B y C: Flores verdes: sección longitudinal de un botón floral 1 y de un botón floral 2, respectivamente. D: flor marchitada: dos mitades de un botón floral 2 en sección longitudinal. E: detalle de la zona de abscisión del pedicelo del botón floral 2 en (D). F: detalle de la zona de abscisión de la mitad proximal de un pedicelo del cual ya se ha caído la flor senescente de *Tom1491*.

pe = peciolo; t= tallo; y= yema axilar.

Escala de las barras: A: 2mm; B-D: 500µm; E, F: 200µm.

***Tom1336* (IF3 = *Iterative Fruit 3*)**

De todos los mutantes afectados en el desarrollo floral, *Tom1336* (al que denominamos como *IterativeFruit 3* o *IF3*) fue sin lugar a dudas el más espectacular.

Hasta el desarrollo de la primera inflorescencia no se detectaron alteraciones relevantes respecto a *Moneymaker*. El porte de la planta era completamente normal y las hojas tenían similar tamaño y arquitectura que las del WT (figura 34A).

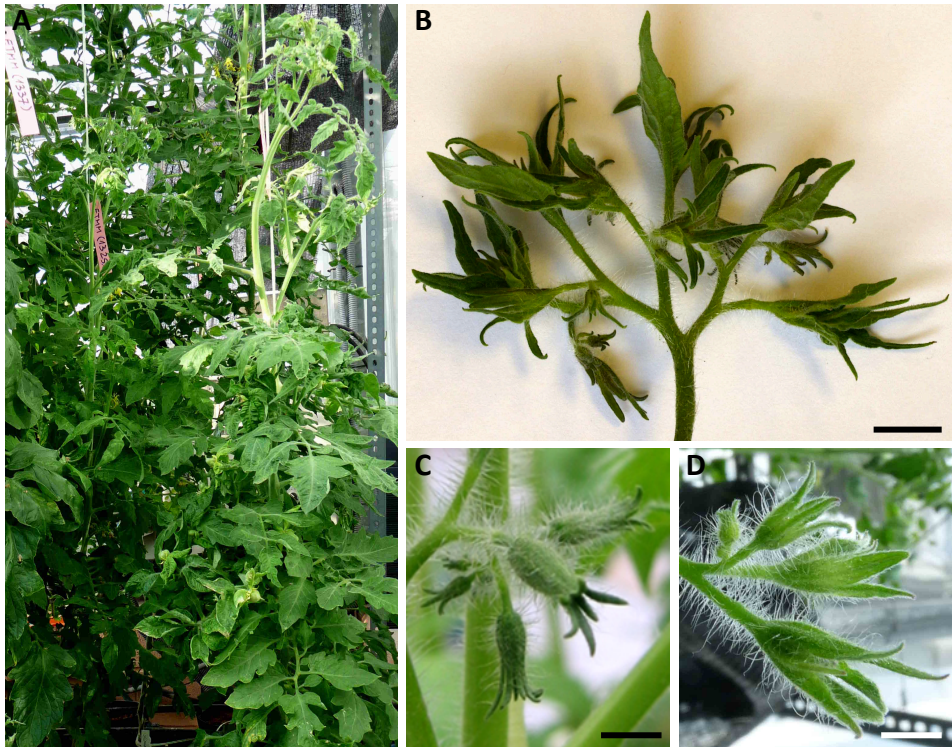


Figura 34. Fenotipo in vivo del mutante *Tom1336*. A: una planta de *Tom1336* (derecha) rodeada de plantas de fenotipo wild-type (izquierda). B: inflorescencia del mutante. C y D: botones florales de *Moneymaker* y de *Tom1336*, respectivamente.

Escala de las barras: B: 1cm; C y D: 5mm.

Sin embargo, desde los primeros estadios del desarrollo de la flor se vio que éstas eran diferentes a las de *Moneymaker*. En los estadios de botón floral, los sépalos eran de mayor calibre. Mientras que en *Moneymaker* la longitud de los sépalos suele ser aproximadamente igual a la de los pétalos o los estambres (figura 35B), en el mutante

RESULTADOS COLECCIÓN T-DNA Y MUTANTES

tenían casi el doble de longitud que el resto de verticilos (figuras 34B-34D). En estadios más avanzados, además del mayor tamaño, los sépalos adquirían la morfología y textura de una hoja (figuras 34D, 35A y 35E). Por otro lado, los pétalos nunca alcanzaban la pigmentación típica amarilla, sino que eran de color verde claro en estadio de antesis (figura 35D) o de color verde amarillento en estadios más avanzados del desarrollo (figura 35E). Por lo que respecta a los estambres, nunca llegaban a formar un cono estaminal (ver figura 35C) y en estadio de antesis carecían de polen. El ovario exhibía un desarrollo prematuro, con un engrosamiento considerable en estadio de preantesis (figura 35C) y un enorme tamaño en el estadio de antesis (figura 35D).

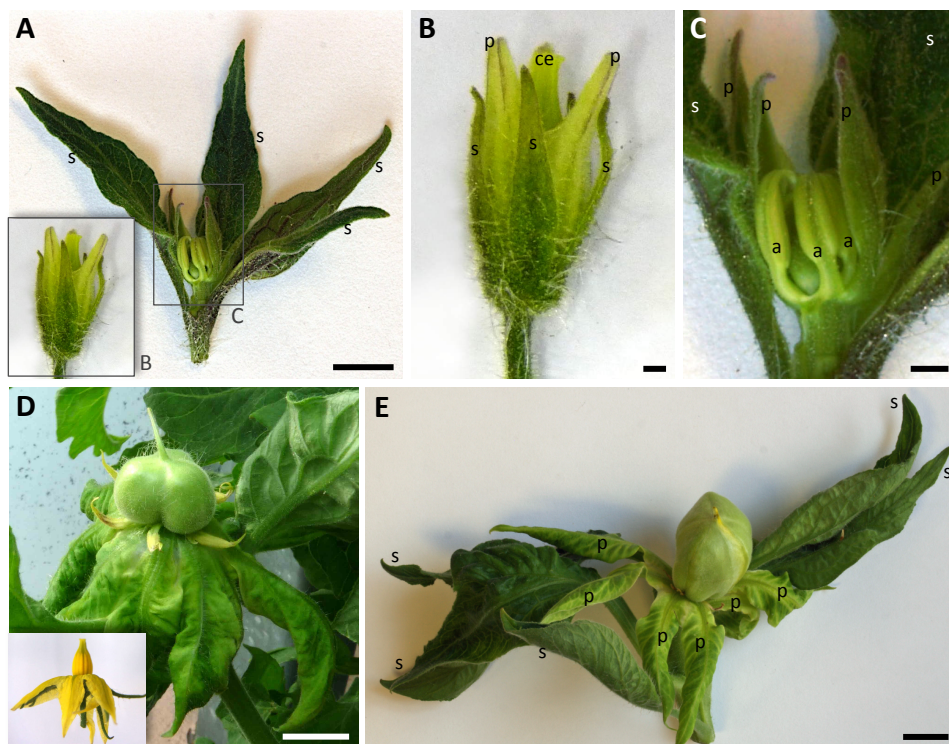


Figura 35. Flores del mutante *Tom1336* en diversos estadios de desarrollo. A: flor de *Tom1336* en estadio de desarrollo equivalente a una preantesis (para una mejor observación, se eliminó un sépalo) y flor de MoneyMaker en preantesis a la misma escala (recuadro). B y C: detalle de (A). D: flor de *Tom1336* en estadio de desarrollo equivalente a una antesis y flor de MoneyMaker en antesis a la misma escala (recuadro). E: flor de *Tom1336* en estadio de desarrollo asimilado a una postantesis.

a= antera; ce= cono estaminal; p= pétalo; s= sépalo.
Escala de las barras: A: 5mm; B, y C: 1mm; D y E: 1cm.

En realidad, la adscripción de un estadio de desarrollo floral era difícil en este mutante, y teniendo en cuenta que los pétalos no adquirían la pigmentación amarilla y la flor estaba semi-abierta desde estadios muy tempranos, nos resultó complicado saber cuándo la flor se encontraba en estadio de antesis. Sin embargo, como los estambres sí que adquirían la pigmentación amarilla típica de los del WT, decidimos asignar el estadio de antesis al momento en el que los estambres alcanzaban este grado de pigmentación (figura 35D).



Figura 36. A: fruto verde abierto de *Tom1336* claramente iterativo que da lugar a una flor compuesta, cuyos ovarios a su vez son iterativos (para una mejor observación, se eliminaron todos los sépalos de las flores secundarias). B: sección transversal de los ovarios de la flor compuesta en (A). C: detalle de un ovario de la flor compuesta en (B).

Escala de las barras: A: 1cm; B: 5mm; C: 1mm.

El ovario era de morfología irregular y parecía surgir de una especie de pedúnculo que tenía una cierta semejanza con el suspensor de un embrión (ver figura 35C). En estadios posteriores a la antesis, la irregular morfología del fruto se hacía cada vez más patente (figuras 35E, 37A). Pudimos ver que cuando se alcanzaba un determinado estadio de desarrollo, los frutos se abrían y del interior surgía una nueva flor hipertrofiada (figura 36A). En esa flor eran claramente distinguibles los diferentes verticilos flores (i.e. sépalos, pétalos, estambres y ovario) y en el interior del ovario se

RESULTADOS COLECCIÓN T-DNA Y MUTANTES

vislumbraban meristemas florales (figuras 36B y 36C). Cuando el mutante ya exhibía síntomas de envejecimiento, en las últimas inflorescencias surgieron frutos que no se abrían y que adquirían la típica coloración roja de un fruto maduro (figuras 37). Estos frutos carecían de semilla y en su interior se podían ver estructuras que parecían ser estambres (figura 37E).

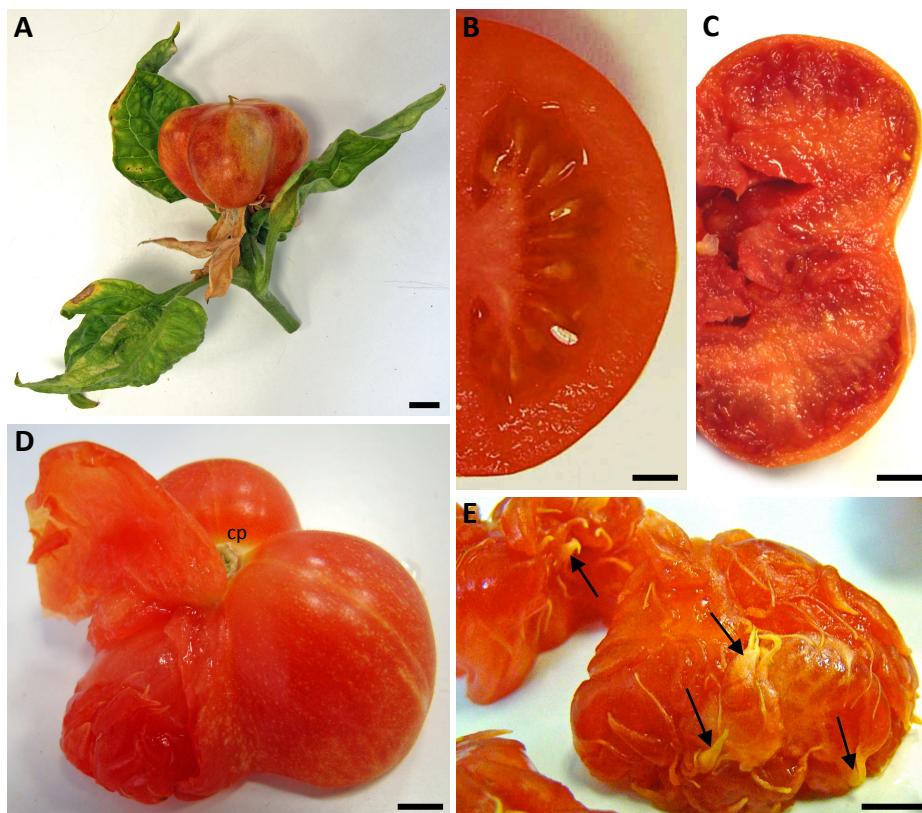


Figura 37. A: fruto cerrado de *Tom1336* en estadio rojo maduro. B y C: sección transversal de un fruto rojo maduro de MoneyMaker y de *Tom1336*, respectivamente. D: mitad proximal de un fruto rojo maduro de *Tom1336* cortado transversalmente, con una parte del pericarpio despegada manualmente que deja entrever el interior del fruto. E: interior de un fruto rojo maduro mutante (las flechas indican algunas estructuras aparentadas a anteras).

cp= cicatriz peduncular.

Escala de las barras: A: 1cm; B-E: 5mm.

A pesar de las notables alteraciones homeóticas, el análisis histoquímico en flores de diferente estadio de desarrollo evidenció la ausencia de expresión GUS en la mayor parte de los tejidos (figura 38). Tan sólo se detectó una leve expresión GUS en los

tejidos vasculares del pedúnculo del ovario y en el interior de frutos en estadios previos a su apertura (figuras 38C y 38E).

Las alteraciones fenotípicas detectadas en este mutante sugieren la alteración de algún gen tipo SEPALLATA. Actualmente, el mutante se está caracterizando a nivel molecular en el laboratorio del Dr. Rafael Lozano.

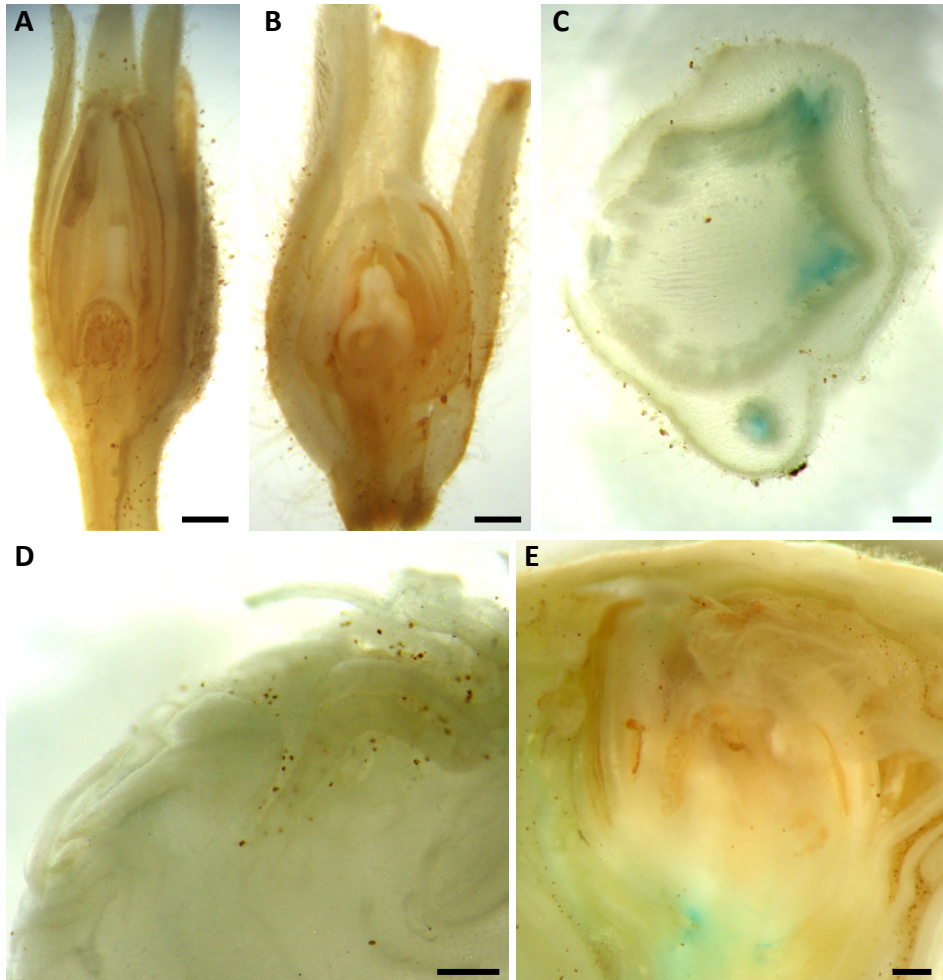


Figura 38. Patrón de expresión GUS en algunos tejidos del mutante *Tom1336*. A y B: botones florales de Moneymaker y del mutante, respectivamente. C: sección transversal del pedicelo de un fruto mutante en estadio verde inmaduro. D: ausencia de expresión GUS en la parte carnosa del interior de un fruto cerrado de *Tom1336* en estadio verde inmaduro. E: expresión del delator en la parte proximal de un neo-meristemo formado en el interior de un fruto mutante cerrado en estadio pintón.

Escala de las barras: 500 μ m.

2.2.3. Descripción de algunos mutantes alterados en el desarrollo de fruto

Tom1280

Tom1280 no exhibió alteraciones relevantes en caracteres del desarrollo vegetativo. El fenotipo distintivo de este mutante se observó tras el cuajado de los primeros frutos en la campaña 2009 – 2010. En concreto, el mutante desarrolló frutos de morfología más achatada, de menor calibre (en torno a 3,5 cm frente a los 5 cm de Moneymaker), de cutícula áspera y carentes de brillo (figura 81B). Además, los frutos no tenían semillas.

El mutante se cultivó de nuevo en la campaña 2010 – 2011 para analizar con mayor detalle las alteraciones fenotípicas. Para nuestra sorpresa, cuando empezaron a aparecer los primeros frutos se vio un fenotipo completamente diferente. En concreto, los frutos eran de similar calibre y morfología que los de Moneymaker (figuras 39E y 39F) pero tenían manchas a lo largo de toda su superficie (frutos 'tipo tigre'). Estas manchas se podían ver claramente tanto en estadio de fruto verde como en el estadio rojo maduro (figuras 39C y 39D). Además, al igual que los de Moneymaker, los frutos contenían semilla.

Recientemente, se ha cultivado de nuevo tanto el mutante original como una muestra representativa de plantas TG2 procedentes de los frutos con manchas. En concreto, se han cultivado 3 réplicas clonales del mutante y 12 plantas TG2.

Se ha visto que en las tres plantas TG1 aparecen los dos fenotipos de fruto observados en las dos cosechas previas. De hecho, en la misma planta se pudo ver que las flores de algunas inflorescencias tenían sépalos tipo hoja y producían frutos cordiformes, mientras que otras daban frutos con manchas (i.e. frutos tipo tigre).



Figura 39. Fenotipo de las flores y de los frutos del mutante *Tom1280*. A: flores del mutante. B: frutos del mutante el primer año de cosecha. C y D: frutos del mutante en estadio verde maduro y rojo maduro, respectivamente. E y F: frutos de Moneymaker en estadio verde maduro y rojo maduro, respectivamente. Escala de las barras: 1cm.

Por lo que respecta a las plantas TG2, se ha visto que, de las 12 plantas cultivadas, una dio frutos cordiformes sin semilla (aunque los sépalos eran como los del WT) y otra frutos con manchas. En el resto de las plantas no se observaron alteraciones fenotípicas. En principio no tenemos datos que permitan saber si se trata de una dos mutaciones independientes y si el anómalo modo de herencia se debe a menor expresividad y/o menor penetración del alelo o alelos mutantes debido a una interacción medioambiental. Durante este año, se va a cultivar un mayor número de plantas tanto del mutante como de la progenie en otras condiciones medioambientales (en concreto, en los invernaderos del grupo del Dr Lozano en Almería) y se van a llevar a cabo análisis moleculares de las plantas para tratar de esclarecer el modo de herencia.

Tom654

Tom654 es un mutante que exhibió pleiotropía. Desde los primeros estadios de desarrollo, se vio que tenía un porte más débil y desarrollaba hojas de menor calibre que exhibían síntomas de senescencia prematura (figuras 40A-40D).

Con el desarrollo de las primeras inflorescencias se pudo apreciar que las flores del mutante no eran muy distintas a las del WT, aunque no llegaban a abrirse completamente en estadio de antesis (figura 41A).

Los frutos tenían una morfología distinta a los de Moneymaker desde los primeros estadios de desarrollo y eran de menor calibre. La mayor parte eran apuntados, e incluso había algunos de tipo cordiforme (figuras 41B, 41D y 41E vs 41C, 41F, 41G, 41H y 41I). Con independencia del grado de apuntamiento, todos los frutos carecían de semilla (figuras 41J vs 41K).

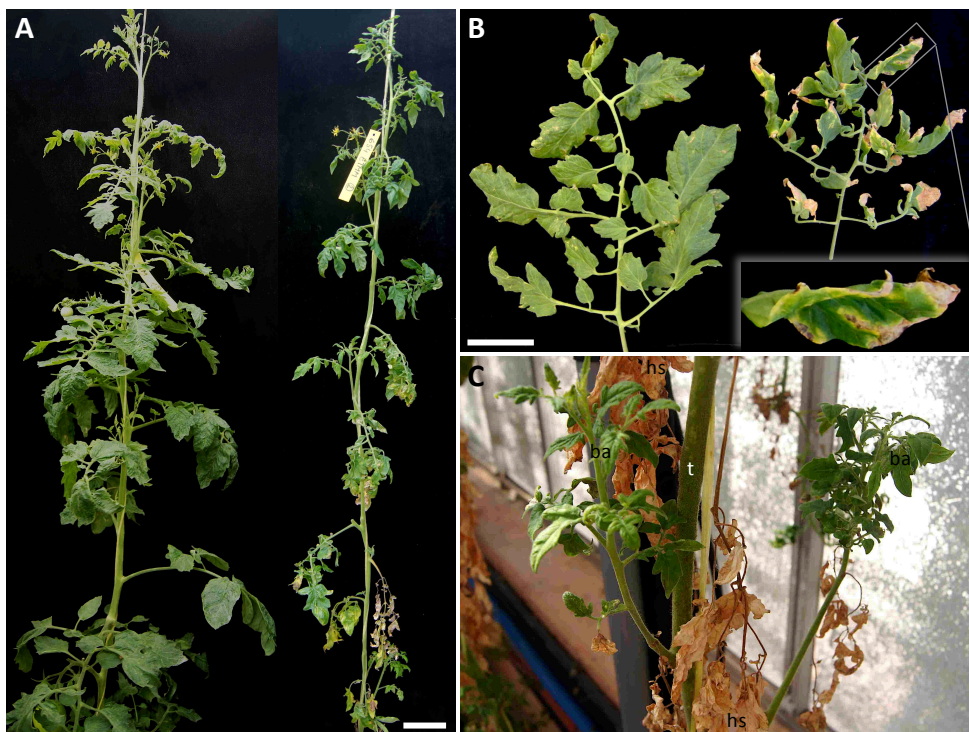


Figura 40. Desarrollo vegetativo *in vivo* del mutante *Tom654*. A: planta adulta de Moneymaker (izquierda) y del mutante (derecha). B: hoja de 3 meses de Moneymaker (izquierda) y del mutante (derecha). *Recuadro*: detalle de un foliolo mutante. C: detalle del tallo, de brotes axilares y de hojas totalmente senescentes en una planta del mutante. ba= brote axilar; hs= hoja senescente; t= tallo. Escala de las barras en A y B: 10cm.

El análisis histoquímico con X-Gluc reveló la expresión del delator *Uida* en diferentes partes vegetativas y reproductivas de la planta. En tejidos u órganos vegetativos se detectó tinción GUS en las zonas de corte de tallo (figuras 42B y 42C) y en haces vasculares de raquis, peciólulo y limbo de hoja (figuras 42E-42G). También se observó una intensa tinción GUS en la región de ramificación del peciólulo (figura 42H). Sin embargo, no se detectó expresión del delator en órganos jóvenes, como por ejemplo el ápice meristemático o las yemas axilares.

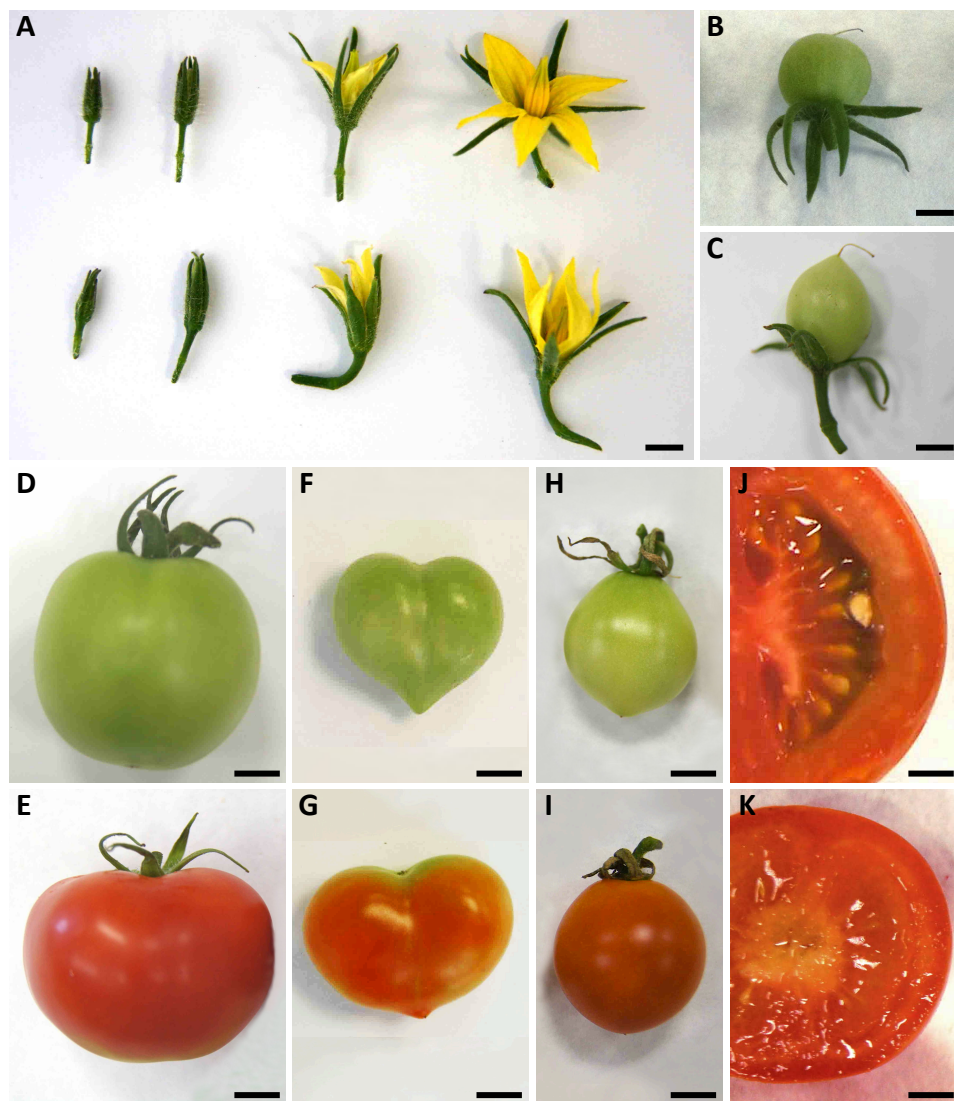


Figura 41. Desarrollo reproductivo del mutante *Tom654*. A: estadios florales de botón floral 1, botón floral 2, preantesis y antesis de Moneymaker (arriba) y *Tom654* (abajo). B y C: fruto de 1cm de diámetro de Moneymaker (arriba), y de *Tom654* en cosechas siguientes a la primera cosecha (abajo). D y E: fruto verde maduro y rojo maduro de Moneymaker, respectivamente. F-I: fruto verde maduro y rojo maduro de *Tom654* el primer año de cosecha (F, G) y en las cosechas siguientes (H-I). J y K: interior de un fruto de Moneymaker y de un fruto mutante, respectivamente.
Escala de las barras: A-C, J, K: 5mm; D-I: 1cm.

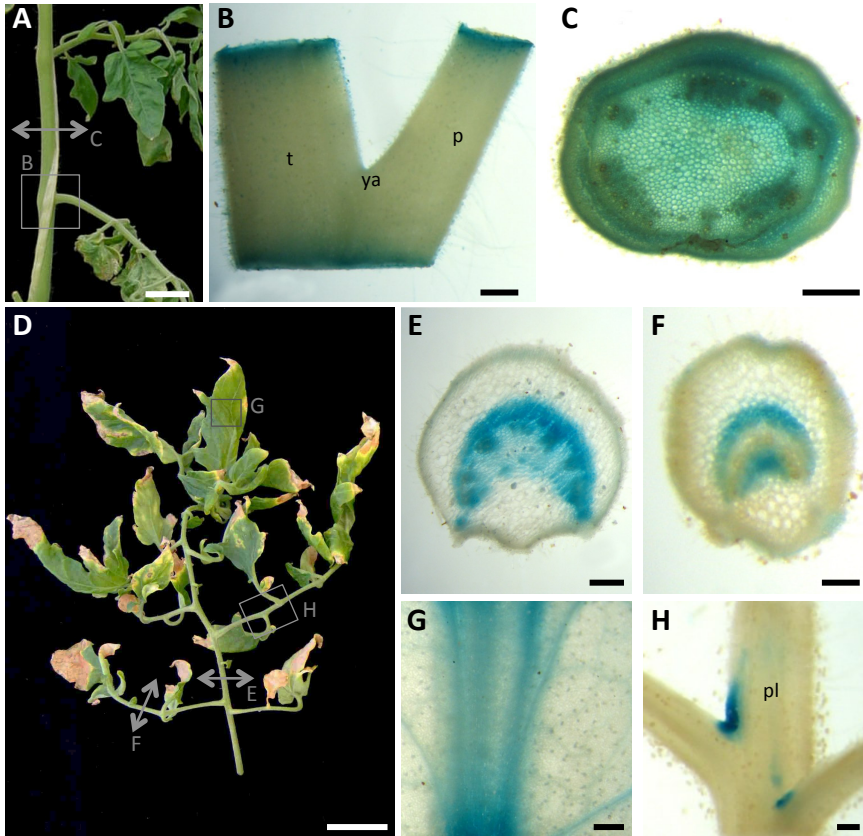


Figura 42. Expresión GUS en las partes vegetativas del mutante *Tom654*. A: detalle de un tallo joven con hojas de una planta de *Tom654*. B: segmento de tallo joven cortado a nivel del nudo, en el cual también se ha seccionado el peciolo de la hoja. C: sección transversal de tallo joven. D: hoja adulta del mutante. E y F: sección transversal del raquis y del peciolulo de una hoja adulta, respectivamente. G: expresión del delator en limbo. H: detalle de la expresión GUS en el peciolulo de una hoja adulta.
p= peciolo; pl= peciolulo; t= tallo; ya= yema axilar.
Escala de las barras: A: 2cm; B, C, E, G, H: 500µm; D: 5cm; F: 200µm.

En flores, la expresión del delator se detectó desde los primeros estadios de desarrollo (figura 43A). La expresión GUS se localizaba en la base del ovario, estilo y estigma en todos los estadios del desarrollo floral (figuras 43B-43G). También se observó tinción GUS en las zonas de corte del pedicelo de la flor (figura 43H) en todos los estadios del desarrollo floral. En pétalos la expresión del delator (figura 43F) dejó de verse a partir del estadio de antesis. No se puede descartar que la expresión GUS en las zonas del ovario tenga algún tipo de relación con la morfología que finalmente adquiere el fruto.

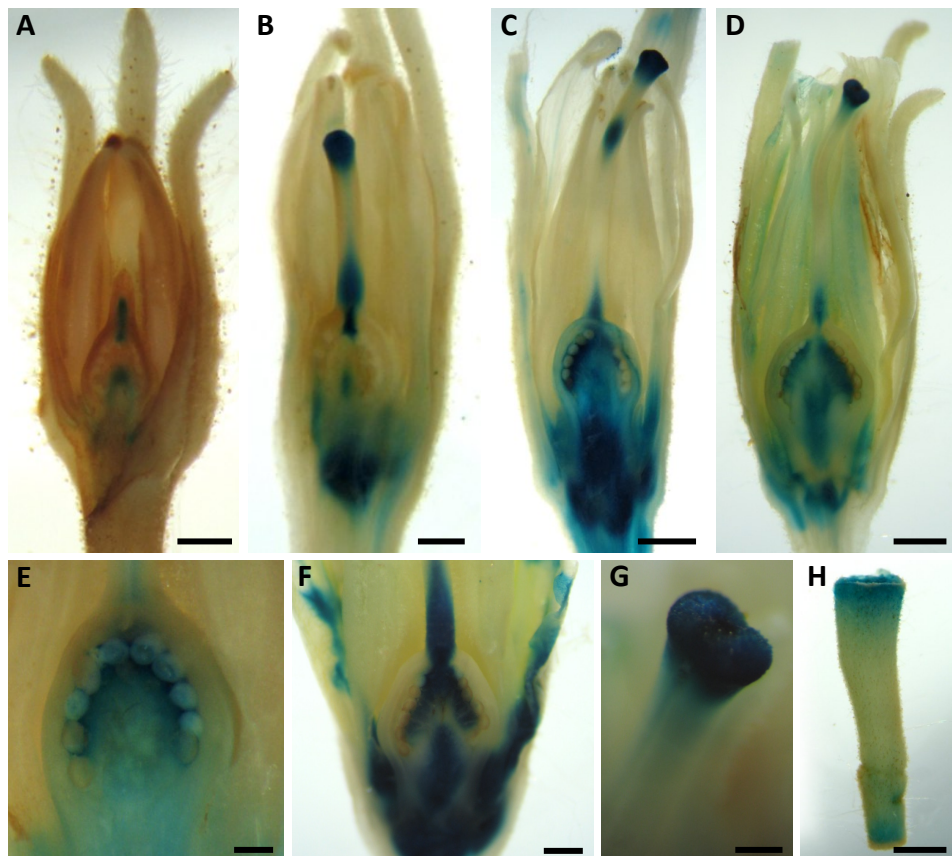


Figura 43. Expresión GUS en las flores del mutante *Tom654*. A-D: secciones longitudinales de flores en estadio de botón floral temprano, de botón floral 1, de botón floral 2 y de 7 días postantesis, respectivamente. E: detalle del interior del ovario de un botón floral 2. F: detalle de la parte proximal de una flor en antesis. G: detalle del estigma de una flor de 7 días postantesis. H: pedicelo de una flor en estadio de botón floral 2.

Escala de las barras: A, B, F: 500 μ m; C, D, H: 1mm; E, G: 200 μ m..

En los frutos se observó una intensa tinción GUS en diferentes estadios de desarrollo (figuras 44). Se vio que la tinción del delator se extendía a todas las partes del fruto a medida que éste iba creciendo. A pesar de que a partir del estadio de verde maduro se detectan falsos positivos en diferentes tejidos de los frutos WT, la intensa tinción GUS en el mutante podría estar relacionada con el desarrollo diferencial del fruto.

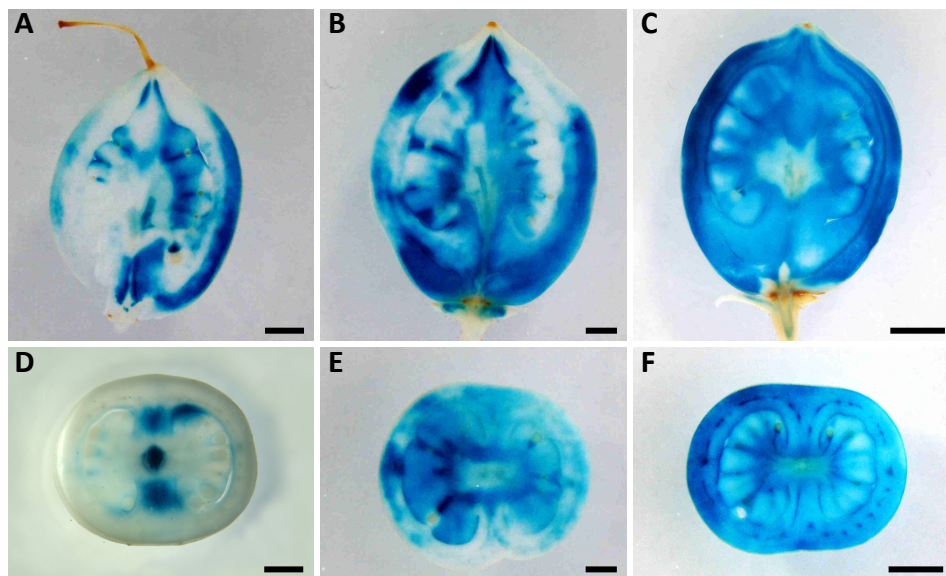


Figura 44. Expresión GUS en los frutos del mutante *Tom654*. Sección longitudinal (arriba) y transversal (abajo), de frutos de diámetro de 1cm (A y D), de 1,5cm (B y E) y de 2cm (C y F). Escala de las barras: A, B, D, E: 2mm; C y F: 5mm.

Además de los mutantes de tipo partenocárpico que se han descrito en este apartado de la Tesis, durante el escrutinio de la colección se detectaron otros mutantes que desarrollaban frutos sin semilla. Habida cuenta de la relevancia de los aspectos relacionados con el desarrollo reproductivo y de que se trata de un carácter de gran trascendencia práctica, decidimos analizarlos con mayor detalle. Aunque los mutantes elegidos exhiben como característica común el desarrollo de frutos partenocárpicos, cada uno de ellos tiene caracteres distintivos a nivel vegetativo (i.e. tamaño de la hoja, morfología de los folíolos o hábito de crecimiento) y reproductivo (tamaño y morfología de la flor, fertilidad, tamaño y morfología del fruto, así como cuajado de fruto). Los siguientes apartados de esta Tesis Doctoral están relacionados con la caracterización de estos mutantes.

3. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE FRUTO PARTENOCÁRPICO

En el apartado anterior, comentamos la gran variedad en los tipos de mutantes detectados en TG1 dentro de la colección de líneas T-DNA que se ha generado durante esta Tesis, algo similar a lo que ocurrió con los trabajos anteriores de nuestro laboratorio. Como no era posible llevar a cabo la caracterización exhaustiva de todos los mutantes que habíamos detectado, decidimos centrar nuestra atención en la caracterización de algunos mutantes con fruto partenocárpico, debido a la relevancia que tiene este carácter en la mejora.

El estudio de los mutantes de frutos partenocárpicos presenta un handicap respecto a otros mutantes: la obtención de descendencia. Obviamente no es posible dejar las plantas autofecundarse y en ocasiones tampoco se consigue la progenie de autofecundación mediante polinización controlada, lo que dificulta la caracterización genética de la mutación. La única solución es conseguir el retrocruzamiento del mutante con el wild-type, tarea no siempre sencilla debido a las múltiples causas de esterilidad (masculina o femenina, funcional o estructural) asociada o relacionada con la formación de frutos partenocárpicos, o de problemas relacionados con el desarrollo de las semillas (e.g. aborto del embrión o colapso de las semillas inmaduras en el caso de los mutantes estenospermocárpicos).

En ocasiones, la formación de frutos partenocárpicos se debe a un cuajado temprano del ovario (e.g. 1-3 días antes de antesis) lo que impide un normal proceso de polinización. Este tipo de partenocarpia suele estar asociada a cambios en los niveles hormonales (e.g. auxinas, citoquininas o giberelinas) y no tiene por qué estar relacionada con esterilidad masculina. Aún así, algunos mutantes de este tipo tienen una menor cantidad de polen fértil, o a veces no lo tienen en absoluto, lo que dificulta o impide la obtención del retrocruce empleando el mutante como parental masculino. El retrocruce inverso es a veces factible realizando la polinización en una etapa anterior a la antesis, pero para ello hace falta caracterizar con detalle la temporalidad del proceso de cuajado de fruto en el mutante, ya que hay que saber el momento exacto en el que conviene realizar la polinización.

En otros mutantes la formación de frutos sin semillas está asociada a problemas relacionados con el desarrollo o viabilidad del polen, lo que de nuevo dificulta o impide el retrocruce empleando el mutante como parental masculino. Algunos investigadores, como por ejemplo los que trabajan en empresas del sector, consideran que esto no es un verdadero caso de partenocarpia.

En algunos mutantes que producen frutos sin semillas, la esterilidad afecta a los gametos femeninos o, más normalmente, a ambos tipos de gametos, masculino y femenino. En este último caso no hay forma de conseguir descendencia en los retrocruces.

En el caso particular de los mutantes estenospermocárpicos, la ausencia de semillas no se debe a ninguna de las causas anteriores. En este tipo de mutantes se asume que la fertilización se produce con normalidad pero, tras la formación del embrión, se produce un aborto del mismo o un desarrollo anómalo de la semilla inmadura lo que determina la formación de rudimentos seminales sin embriones. En teoría, el retrocruce WT x mutante debería lograrse sin problemas, pero en la práctica puede ser más complicado de lo que parece.

La caracterización genética de algunos mutantes partenocárpicos es, por tanto, realmente complicada, debido a la dificultad o imposibilidad de obtener la descendencia de autofecundación y a las dificultades para lograr los retrocruces en una o ambas direcciones. Este no es el único problema, ya que en muchos casos, al no poder obtener progenies de autofecundación o retrocruzamiento, no es factible llevar a cabo un análisis de cosegregación fenotipo - T-DNA. Por si fuera poco, en el caso de que el mutante tenga más de una copia de T-DNA, no hay forma de separar el inserto responsable del fenotipo mutante a través de un análisis de segregación en las progenies o de un análisis molecular (e.g. PCR o Southern) en cualquier progenie que segregue para las diversas copias de T-DNA.

En el este apartado de la Tesis Doctoral nos hemos centrado precisamente en una serie de mutantes partenocárpicos que, si bien tienen un gran interés por su fenotipo (algunos podrían ser útiles incluso desde el punto de vista de la mejora) adolecen de

RESULTADOS MUTANTES DE FRUTO PARTENOCÁRPICO

diversos problemas que impiden la obtención de progenies y/o que tienen diversas copias de T-DNA.

Como consecuencia, el objetivo de este apartado ha sido realizar una caracterización fenotípica exhaustiva de cada uno de estos mutantes para tratar de inferir cuál es la causa de la partenocarpia y, a partir de aquí, utilizar esta información para decidir cuál es la mejor estrategia para lograr el retrocruzamiento, si es que ello es factible, y en su caso, proceder a la separación del inserto responsable del fenotipo mutante. Lo que esperamos es que la información obtenida sirva el día de mañana para llegar a identificar el gen responsable del fenotipo mutante.

3.1. *Tom1648* (PAB= *Premature Abscission in Breaker*)

3.1.1. Descripción de fenotipo mutante

El mutante *Tom1648* exhibió un crecimiento vegetativo más lento que las plantas de fenotipo silvestre (*Moneymaker*) y un porte más débil (i.e. tallo más delgado). Las hojas del mutante eran de menor tamaño que las de *Moneymaker*, con folíolos más pequeños y de color ligeramente más claro (figura 45).

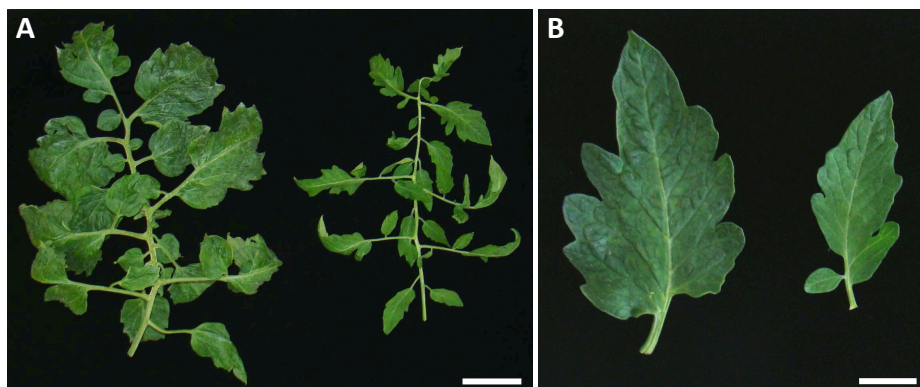


Figura 45. Hojas (A) y folíolos (B) de *Moneymaker* (izda.) y del mutante *Tom1648* (dcha.). Escala de las barras: A: 10cm; B: 2cm.

Las flores del mutante también exhibían notables alteraciones a nivel morfológico. En primer lugar, pudimos apreciar que los sépalos de las flores eran más cortos y los pétalos más delgados que los de *Moneymaker* (figura 46). Asimismo, pudimos apreciar que las flores eran longistilas (tabla 9, figura 46).

Tabla 9. Diámetro del ovario y longitud del estilo en flores en antesis de *Moneymaker* y del mutante *Tom1648*.

Genotipo	Diámetro del Ovario (mm)	Longitud del estilo (mm)
<i>Moneymaker</i>	1,80 ± 0,05 ^a (1,53-2,13) SD= 0,16	7,09 ± 0,19 ^a (6,34-8,23)
<i>Tom1648</i>	2,17 ± 0,15 ^b (1,56-3,16) SD= 0,47	9,62 ± 0,56 ^b (7,41-12,06)

Los valores se expresan como la media ± el error estándar y el rango entre paréntesis. Para cada genotipo, la caracterización se llevó a cabo con 10 flores. Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student). SD= desviación estándar.

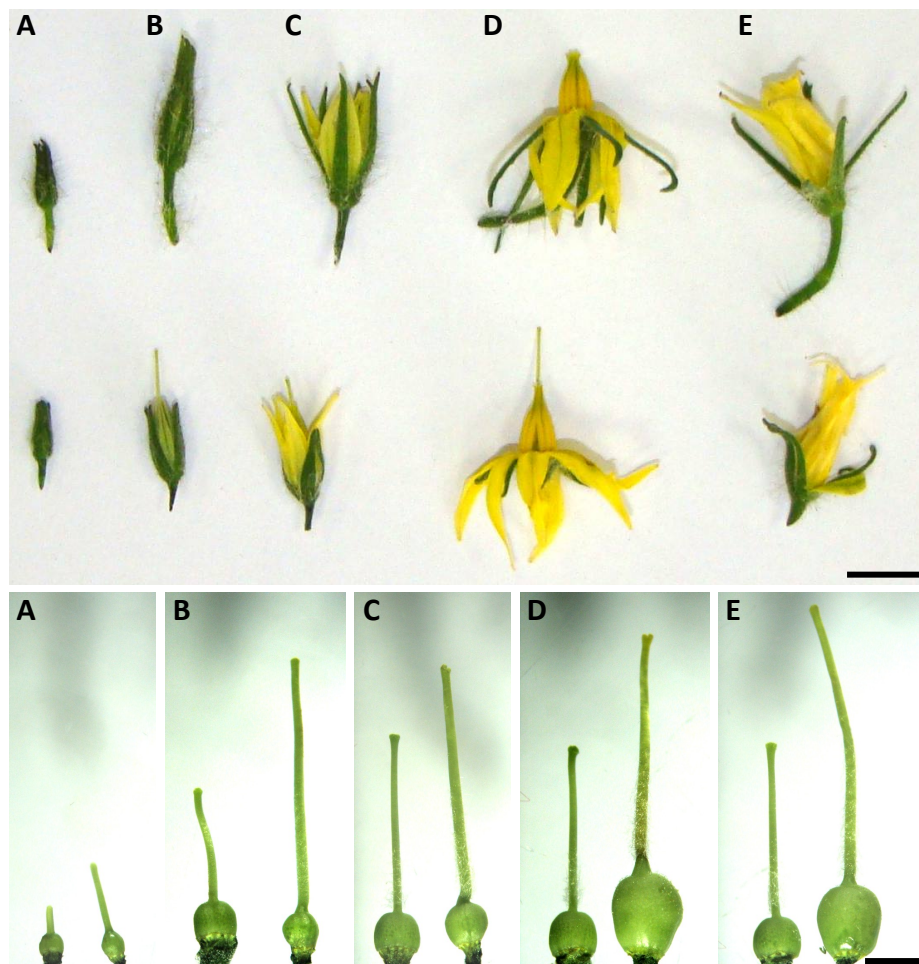


Figura 46. Flores de Moneymaker y de *Tom1648* (arriba Moneymaker y debajo el mutante) y pistilos de estas flores (izquierda Moneymaker y derecha el mutante) en los estadios de botón floral 1 (A), botón floral 2 (B), preantesis (C), antesis (D) y 2 días postantesis (E). Escala de las barras: arriba: 1cm; abajo: 2mm.

Por lo que respecta al ovario, no se detectaron diferencias de tamaño respecto a los de Moneymaker hasta el estadio de preantesis. Sin embargo, a partir del estadio de antesis, se pudo apreciar que los ovarios del mutante eran significativamente mayores que los de Moneymaker (figura 46D y 46E). En efecto, el diámetro promedio del ovario de la flor del mutante en antesis fue de 2,17 mm mientras que en Moneymaker fue de 1,80 mm (tabla 9). Por otra parte, tal y como se puede ver en la tabla 9, se observó

mayor variabilidad en el diámetro de los ovarios del mutante (desviación estándar de 0,47) que en los de Moneymaker (desviación estándar de 0,16). Al respecto, conviene indicar que aunque los ovarios de menor calibre del mutante tenían un diámetro similar a los de menor calibre de Moneymaker (1,56 mm respecto a 1,53 mm), la mayor parte de los ovarios del mutante superaba los 2,3 mm de diámetro.

La forma del fruto del mutante era muy distinta a la típica morfología redondeada y un tanto achatada del fruto de Moneymaker. Desde los primeros estadios de desarrollo se pudo ver que los frutos del mutante eran más bien alargados, tal y como indica el índice de forma longitudinal (IFL = 1,19 > 1), mientras que los de Moneymaker (IFL = 0,81 < 1) son ligeramente achatados (tabla 10 y figuras 47A y 47B). En la madurez, los frutos tenían una altura similar a los de Moneymaker (3,9 cm) pero un diámetro considerablemente inferior (3,3 cm en el mutante respecto a 4,8 cm en Moneymaker; tabla 10) .

Por otra parte, los frutos del mutante eran de menor calibre y carecían de semilla, observándose en su lugar rudimentos seminales (figura 47C).

Como se comentaba en un párrafo anterior, la zona de abscisión del pedicelo del fruto también presentaba alteraciones. Pudimos ver que la mayoría de los frutos del mutante se caían en estadios previos a la maduración (i.e. pintón). Sin embargo, en las últimas inflorescencias, los frutos se desprendían en estadios de desarrollo más avanzados. Aun así, en ningún momento se llegaron a observar frutos del mutante en estadio rojo maduro. El estadio más avanzado que alcanzaron los frutos del mutante correspondía con un color rojo-anaranjado (figura 47A y 47B).

Un aspecto que merece la pena destacar es que, incluso en esta etapa, los frutos del mutante exhibían siempre una firmeza similar a la de frutos de Moneymaker en estadio verde maduro. Es más, tras separarlos de la planta y dejarlos embolsados un tiempo, estos frutos nunca alcanzaron el estadio de rojo maduro. Estos resultados podrían indicar que, aparte de los caracteres anteriormente mencionados, la mutación altera la capacidad del fruto para alcanzar la maduración completa.

Tabla 10. Características de los frutos de Moneymaker y de *Tom1648*.

Genotipo	Altura (cm)	Diámetro (cm)	IFL
Moneymaker	$3,9 \pm 0,1^a$ (2,9-5,0)	$4,8 \pm 0,1^a$ (3,8-6,2)	$0,81 \pm 0,01^a$ (0,70-1,00)
<i>Tom1648</i>	$3,9 \pm 0,1^a$ (3,3-4,7)	$3,3 \pm 0,1^b$ (2,8-4,0)	$1,19 \pm 0,04^b$ (0,88-1,40)

Los valores se expresan como la media \pm el error estándar y el rango entre paréntesis. La caracterización se llevó a cabo con 31 frutos de Moneymaker y 16 frutos del mutante. Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student).

IFL= Índice de forma longitudinal.

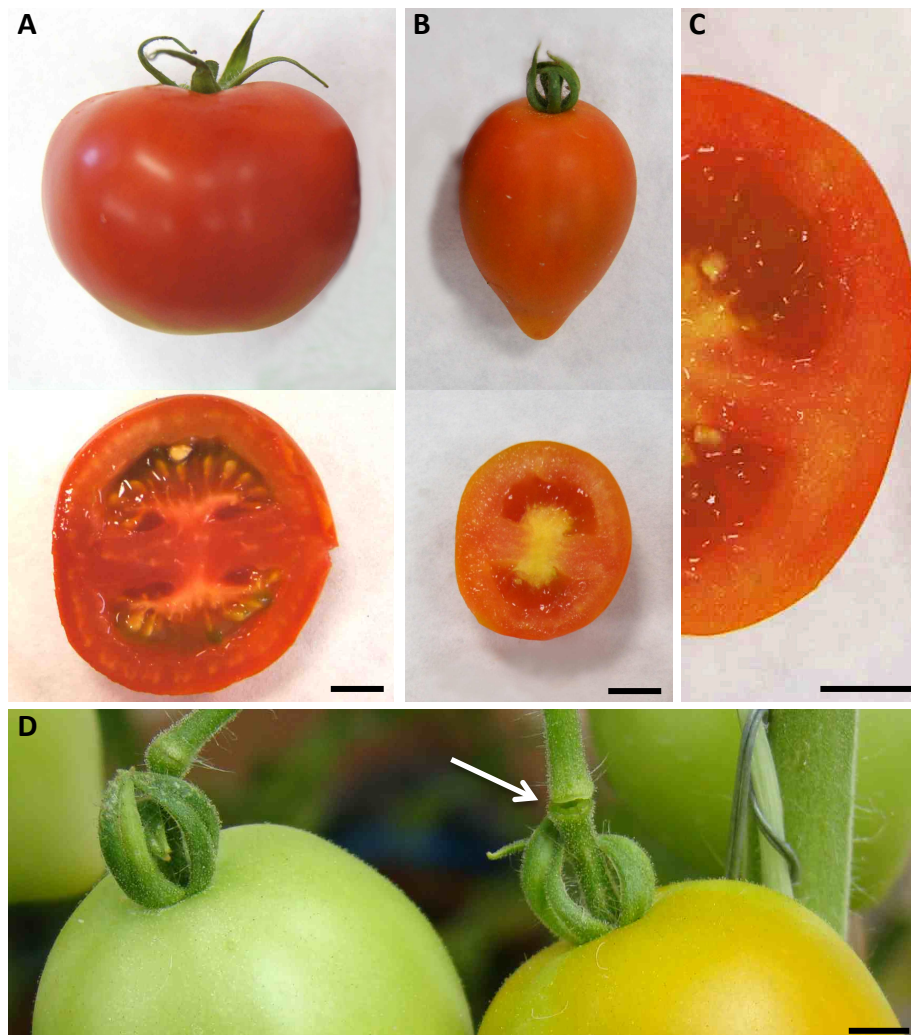


Figura 47. A y B: frutos de Moneymaker (A) y de *Tom1648* (B). C: detalle del interior de un fruto del mutante. D: detalle de la zona de abscisión del pedicelo de frutos inmaduros del mutante en la planta.

Escala de las barras: A y B: 1cm; C y D: 5mm.

Conviene indicar que las alteraciones observadas en el mutante se han podido contrastar a lo largo de varias cosechas y en diferentes condiciones ambientales (i.e. en invernaderos diferentes).

Además de estas alteraciones, a lo largo de las distintas cosechas pudimos observar que en las inflorescencias del mutante se desarrollaban más frutos que en las de Moneymaker. Decidimos estimar, por tanto, la tasa de cuajado en dos réplicas clonales del mutante y en el WT (figura 48).

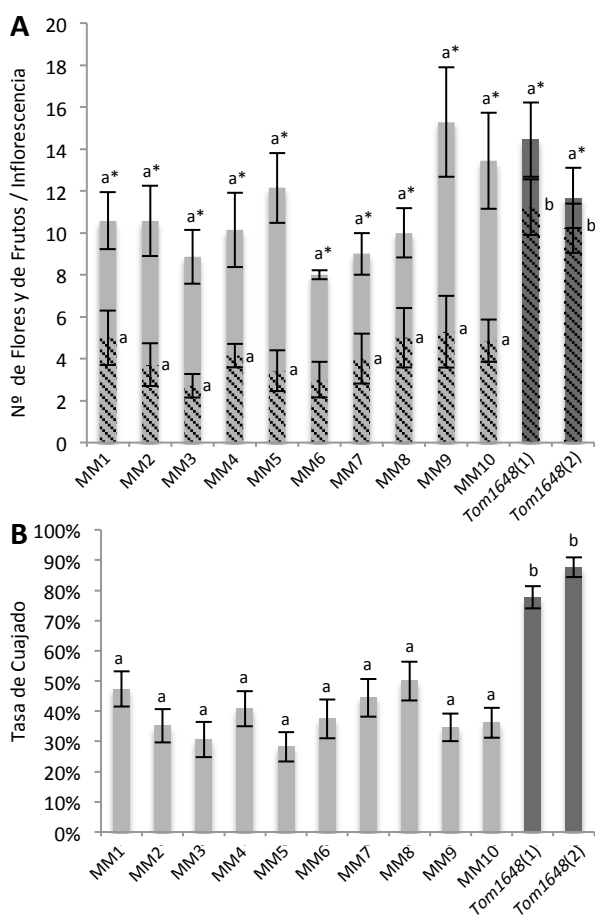


Figura 48. Cuajado en el mutante *Tom1648*. A: nº de flores (barras lisas) y de frutos (barras con trama) por inflorescencia en 10 plantas de Moneymaker (MM1 a MM10) y 2 plantas del mutante (*Tom1648*(1) y *Tom1648*(2)). B: tasa de cuajado de las plantas en (A). C: detalle del cuajado de fruto en una inflorescencia de Moneymaker (arriba) y en una del mutante (abajo).

Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; contraste múltiple de rango).

Las plantas mutantes desarrollaron en torno a 2 flores más por inflorescencia, aunque las diferencias con respecto al WT no resultaron significativas desde un punto de vista estadístico. Sin embargo, en el mutante cuajaron más del doble de frutos por inflorescencia que en el WT. Es decir, se comprobó que, acorde con lo que se había visto en cosechas previas, la tasa de cuajado del mutante era significativamente mayor, concretamente, de casi el 85% mientras que el WT tenía una tasa de cuajado cercana al 40%.

3.1.2. Análisis de las alteraciones en el desarrollo reproductivo

Habida cuenta de que todos los frutos que cuajaban en el mutante carecían de semilla, intentamos obtener descendencia mediante polinización manual y, al mismo tiempo, tratamos de llevar a cabo retrocruces con Moneymaker en ambos sentidos, es decir, utilizando al mutante como donador de polen o empleándolo como receptor. Esto nos habría permitido llevar a cabo el análisis genético de la mutación. En teoría, al tratarse de una mutación dominante, la descendencia de la autofecundación se debería haber ajustado a una segregación de 3 plantas con fenotipo mutante y 1 con fenotipo silvestre. Por lo que respecta a los retrocruces, las descendencias se deberían aproximar a segregaciones 1:1, es decir, 1 planta con fenotipo mutante y 1 con fenotipo silvestre. Además, la disponibilidad de descendencias procedentes de autofecundación y retrocruce habrían permitido determinar la existencia de cosegregación entre el inserto y la mutación. Como, además, en el caso de este mutante, el análisis Southern indicó la integración de tres insertos de T-DNA, los retrocruces habrían permitido separar la presunta copia responsable de la mutación. Desafortunadamente, no conseguimos obtener descendencia a pesar de que se intentó a lo largo de varias cosechas. Consecuentemente, nos planteamos como hipótesis que el mutante debía exhibir alteraciones tanto en el polen como en los óvulos.

Decidimos, por tanto, realizar una prueba de viabilidad de polen, observando al microscopio la cantidad y el tipo de polen producido por las flores del mutante y de Moneymaker en nuestras condiciones de cultivo. El ensayo de viabilidad mediante

tinción con acetocarmín confirmó nuestras sospechas. En las flores de las plantas mutantes, conseguimos extraer granos de polen cortando longitudinalmente la antera y ayudándonos con una hoja de bisturí, ya que era extremadamente difícil extraer polen de estas flores mediante la técnica que tradicionalmente empleábamos. En cambio, en Moneymaker el polen lo extraíamos fácilmente golpeando la flor con la ayuda de una pinza tras separar previamente los estambres. Como se puede ver en la figura 49, los granos de polen de las flores mutantes exhibían una morfología aberrante y carecían de tinción, mientras que los de las flores de Moneymaker eran completamente esféricos y se teñían perfectamente.

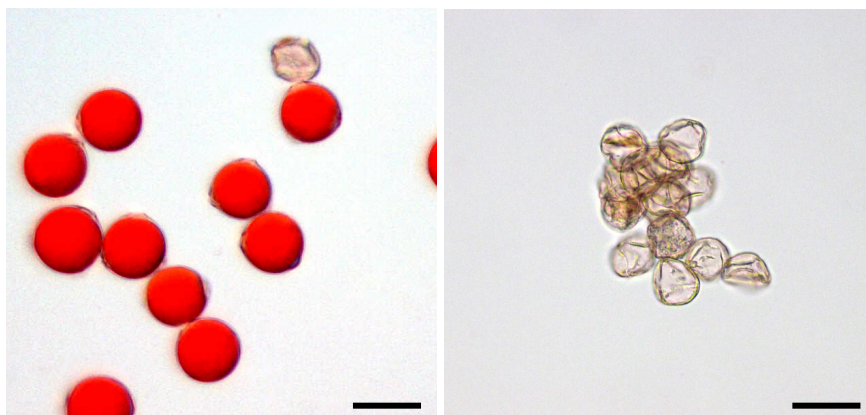


Figura 49. Tinción vital con acetato de carmín del polen de Moneymaker (izda.) y del polen de *Tom1648* (dcha.).
Escala de las barras: 20 μ m.

Con el fin de confirmar estos resultados y, además, ver posibles alteraciones en otras partes de la flor (i.e. óvulos), se realizó un análisis histológico en diferentes estadios del desarrollo floral. Pudimos observar claramente que, en estadio de antesis, los sacos polínicos de las flores del mutante contenían polen aunque de morfología irregular y aparentemente vacíos de contenido (figura 50H), a diferencia de lo que se observaba en Moneymaker cuyos granos de polen eran esféricos y opacos (figura 50G).

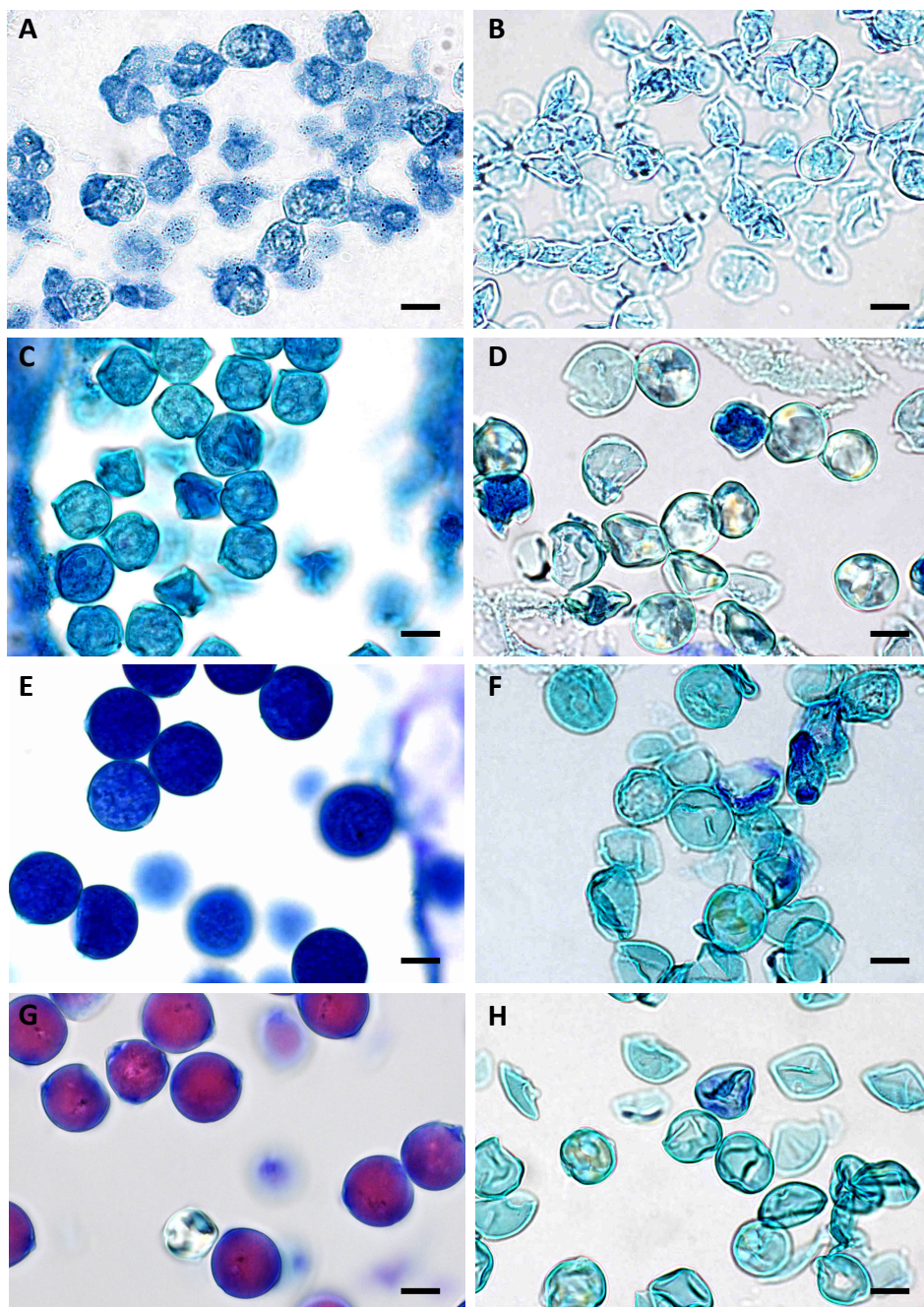


Figura 50. Polen de flores de Moneymaker (izda.) y de *Tom1648* (dcha.) en los estadios de botón floral 1 (A y B), botón floral 2 (C y D), preantesis (E y F) y antesis (G y H). Escala de las barras: 10 μ m.

Las diferencias eran claras en todos los estadios de desarrollo que se analizaron, incluso en los más tempranos. En efecto, en estadio de botón floral 1, el cual se corresponde con el estadio de desarrollo 10-11 descrito por Brukhin *et al.* (2003), en flores de Moneymaker parte del polen se encuentra en el estado de microsporas libres. En este estadio se produce la separación de las tétradas ya que algunas se encuentran aún embebidas en calosa, y las microsporas exhiben coloración azul tras la tinción con azul de toluidina (figura 50A). En este estadio de desarrollo el polen del mutante exhibe una morfología ligeramente distinta y una coloración más tenue tras la tinción con azul de toluidina (figura 50B).

En el estadio de botón floral 2 se produce un notable incremento del tamaño del grano de polen tanto en Moneymaker como en el mutante. En Moneymaker, todo el polen se encuentra en el estadio de microspora libre y exhibe una morfología esférica aunque irregular y una coloración azul tenue tras la tinción con azul de toluidina (figura 50C). En el mutante, sin embargo, los granos presentan una morfología más irregular y ausencia de coloración tras la tinción (figura 50D).

En el estadio de preantesis, los granos de polen de Moneymaker son completamente esféricos, han aumentado su tamaño y adquieren una coloración azul intenso tras la tinción con azul de toluidina (figura 50E). En el caso del mutante, los granos de polen siguen exhibiendo una morfología irregular, no exhiben aparentemente tinción y no han incrementado sustancialmente de tamaño (figura 50F).

Finalmente, en estadio de antesis los granos de polen de Moneymaker se encuentran totalmente formados y exhiben una morfología esférica y un color azul-morado intenso tras la tinción con azul de toluidina (figura 50G). Por el contrario, en el mutante los granos de polen siguen exhibiendo una morfología irregular y adolecen de tinción (figura 50H).

Ante la imposibilidad de obtener semillas de retrocruce utilizando el mutante como receptor de polen, decidimos analizar con más detalle el desarrollo de los ovarios y de los óvulos mediante un análisis histológico (figura 51).

RESULTADOS
MUTANTES DE FRUTO PARTENOCÁRPICO - *Tom1648*

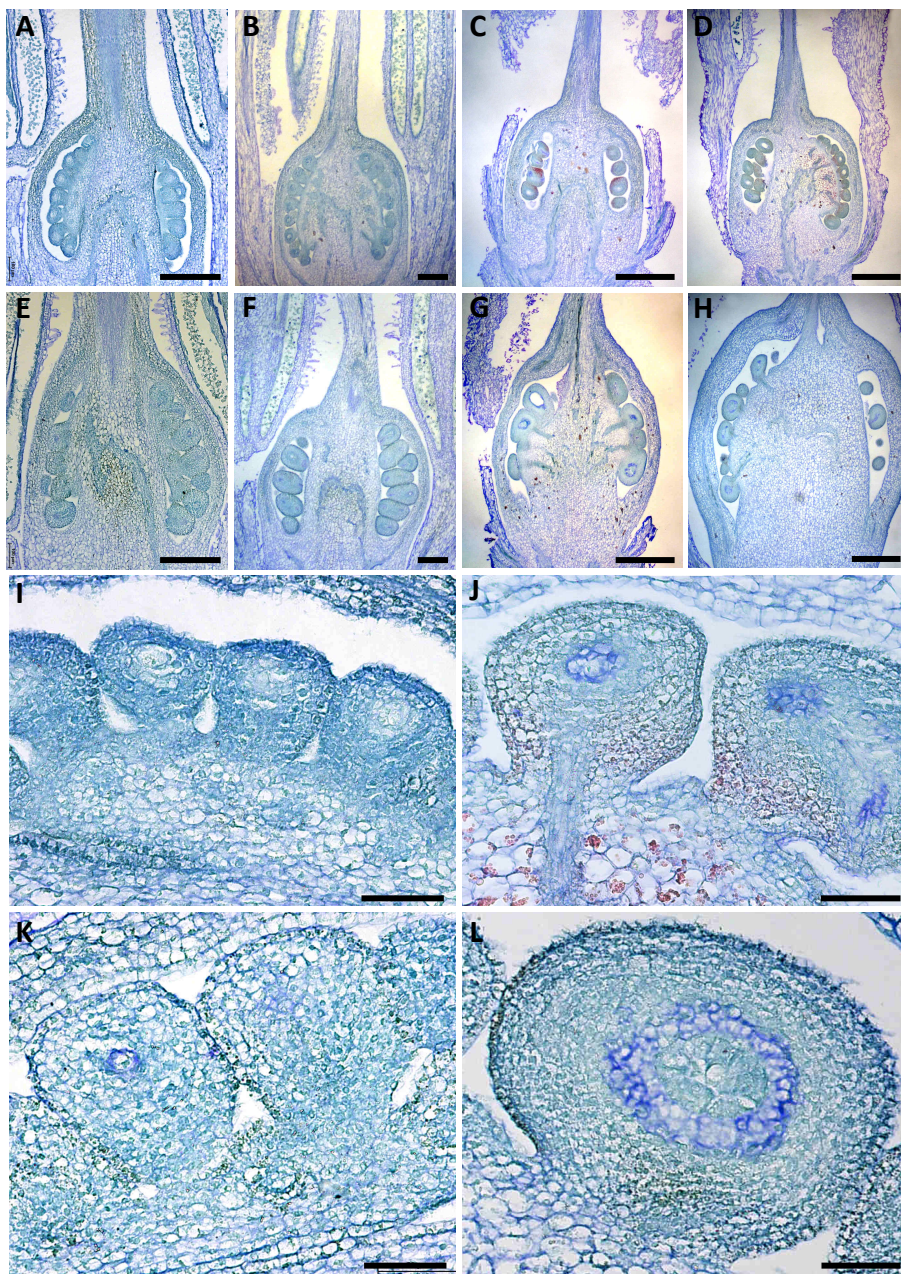


Figura 51. Ovarios y óvulos de MoneyMaker y de *Tom1648*. A-H: secciones longitudinales de ovarios de MoneyMaker (A-D) y del mutante (E-H) en estadios de botón floral 1 (A y E), botón floral 2 (B y F), preantesis (C y G) y antesis (D y H). I-L: óvulos de MoneyMaker (I y J) y del mutante (K y L) en los estadios de botón floral 1 (I y K) y antesis (J y L). Escala de las barras: A, B, E, F: 200 μ m; C, D, G, H: 500 μ m; I-L: 50 μ m.

Como se comentó anteriormente, el calibre de los ovarios del mutante era similar al de Moneymaker hasta el estadio de preantesis. Sin embargo, en el estadio de antesis los ovarios de las flores del mutante experimentaban un incremento de tamaño respecto a los de Moneymaker (ver figura 46). El análisis histológico permitió corroborar los resultados previamente observados a simple vista ya que, tal y como puede apreciarse en la figura 51, en estadio de antesis el calibre de los ovarios del mutante era mayor. También pudimos observar que, en relación con la morfología, los ovarios del mutante eran ligeramente más alargados a partir del estadio de preantesis (figura 51C vs figura 51G).

Con todo, las mayores alteraciones se observaron en los óvulos. En efecto, el calibre de los óvulos en las flores del mutante era significativamente mayor que el de las flores de Moneymaker en todos los estadios de desarrollo analizados (figuras 51A-51H). De hecho, se vio que los óvulos de las flores del mutante en estadio de botón floral 1 eran similares en tamaño a los óvulos de las flores de Moneymaker en estadio de antesis (figura 51I-L).

Analizando con detalle los cortes histológicos, pudimos comprobar que los óvulos del mutante contenían un mayor número de células, aunque su tamaño era similar a las del WT. Por consiguiente, el mayor tamaño de los óvulos de las plantas mutantes podría deberse a procesos prematuros de multiplicación celular. De hecho, el análisis de los cortes histológicos parece evidenciar que el grado de desarrollo de los óvulos del mutante en el estadio de botón floral 1 es similar al de los óvulos de Moneymaker en estadio de antesis (figura 51J vs figura 51K). Lo más interesante es que los óvulos del mutante parece que continúan desarrollándose. De hecho, en el estadio de antesis los óvulos del mutante duplican en tamaño a los de Moneymaker.

Estos resultados podrían explicar el desarrollo prematuro del ovario de las flores del mutante. Se sabe que la fertilización del óvulo generalmente desencadena que el ovario se desarrolle en fruto como consecuencia, en parte, de señales generadas por el óvulo fecundado (de Jong *et al.*, 2009). No se puede descartar, por consiguiente, que el desarrollo anormal de los óvulos pueda estar relacionado con el prematuro cuajado del fruto.

3.1.3. Análisis de la expresión del gen delator *UidA*

Decidimos llevar a cabo un análisis exhaustivo del patrón de expresión del gen delator *UidA* con el fin de determinar si se podía establecer una relación entre las alteraciones observadas en el mutante y la localización de la tinción GUS.

En estructuras vegetativas detectamos expresión GUS en secciones de tallo. Sin embargo, la tinción no parecía ser específica de tejidos concretos (figuras 52A y 52B).

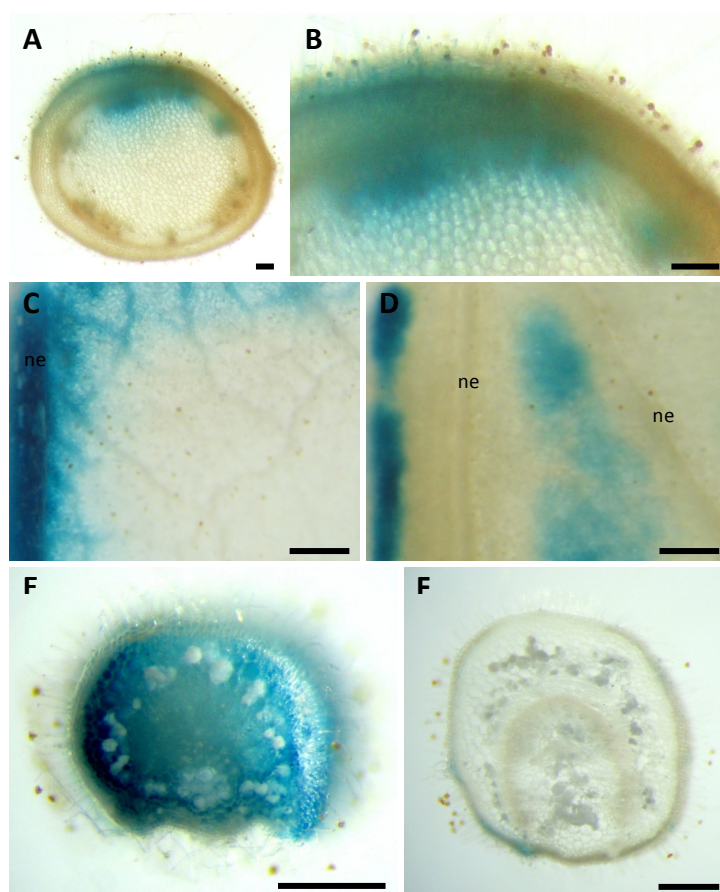


Figura 52. Expresión del delator (*UidA*) en tejidos u órganos vegetativos del mutante *Tom1648*. A: expresión GUS en una sección transversal de tallo. B: detalle de la expresión GUS en tallo. C-D: detalle de la expresión GUS en limbo de hoja. E: expresión GUS en una sección transversal de peciolo. F: expresión GUS en una sección transversal de raquis. ne= nervio. Escala de las barras: 500μm.

En folíolos de hoja también se detectó expresión GUS, pero tampoco encontramos una respuesta específica en un tejido concreto (figuras 52C y 52D). En peciolo de hoja se detectó un patrón de tinción prácticamente ubicuo mientras que en raquis

prácticamente no se detectaba tinción GUS (figuras 52E y 52F). También se analizaron otras estructuras vegetativas como los ápices o las yemas axilares pero no se detectó expresión GUS.

En las flores del mutante se analizó el patrón de expresión del delator en diferentes estadios del desarrollo de la flor. En botón floral de entre 2,5 y 3 mm de longitud no se detectó expresión GUS (figura 53A). Sin embargo, en estadios un poco más avanzados (botón floral de 4 a 5 mm de longitud) se pudo observar expresión del delator en las anteras (figura 53B), lo que podría estar relacionado con el inicio de las alteraciones que se producen en el polen. En el estadio al que nosotros hemos denominado botón floral 1 (6-7 mm de longitud) se observó expresión del delator en el estilo. Este mismo patrón de expresión se observó en el estadio de botón floral 2 (9-10 mm de longitud). Curiosamente, la expresión del delator en estilo ocurre a partir del momento en el que comienzan a detectarse diferencias de tamaño respecto a Moneymaker (apartado 3.1.1, figura 46). También resulta curioso que en estos estadios de desarrollo no se detectó expresión del delator en anteras lo que podría estar relacionado con el momento en el que se produce el deterioro en la formación del polen.

En estadio de preantesis, además de la expresión GUS en estilo, se observó una intensa tinción en el estigma de la flor (figuras 53E y 53F). Conviene indicar que en los estadios de antesis y posteriores desaparece la tinción GUS en estilo y se mantiene la expresión GUS en estigma.

En estadio de antesis se detecta, además de la expresión GUS en estigma, la tinción del delator en diferentes zonas de abscisión floral. Por ejemplo, se observa expresión GUS en la zona de inserción de los diferentes verticilos florales (figura 53G) y en la zona de abscisión del pedicelo (figura 53K). En este sentido, conviene recordar que los frutos de este mutante se desprenden de la inflorescencia como consecuencia aparentemente de un proceso prematuro de senescencia de la zona de abscisión del

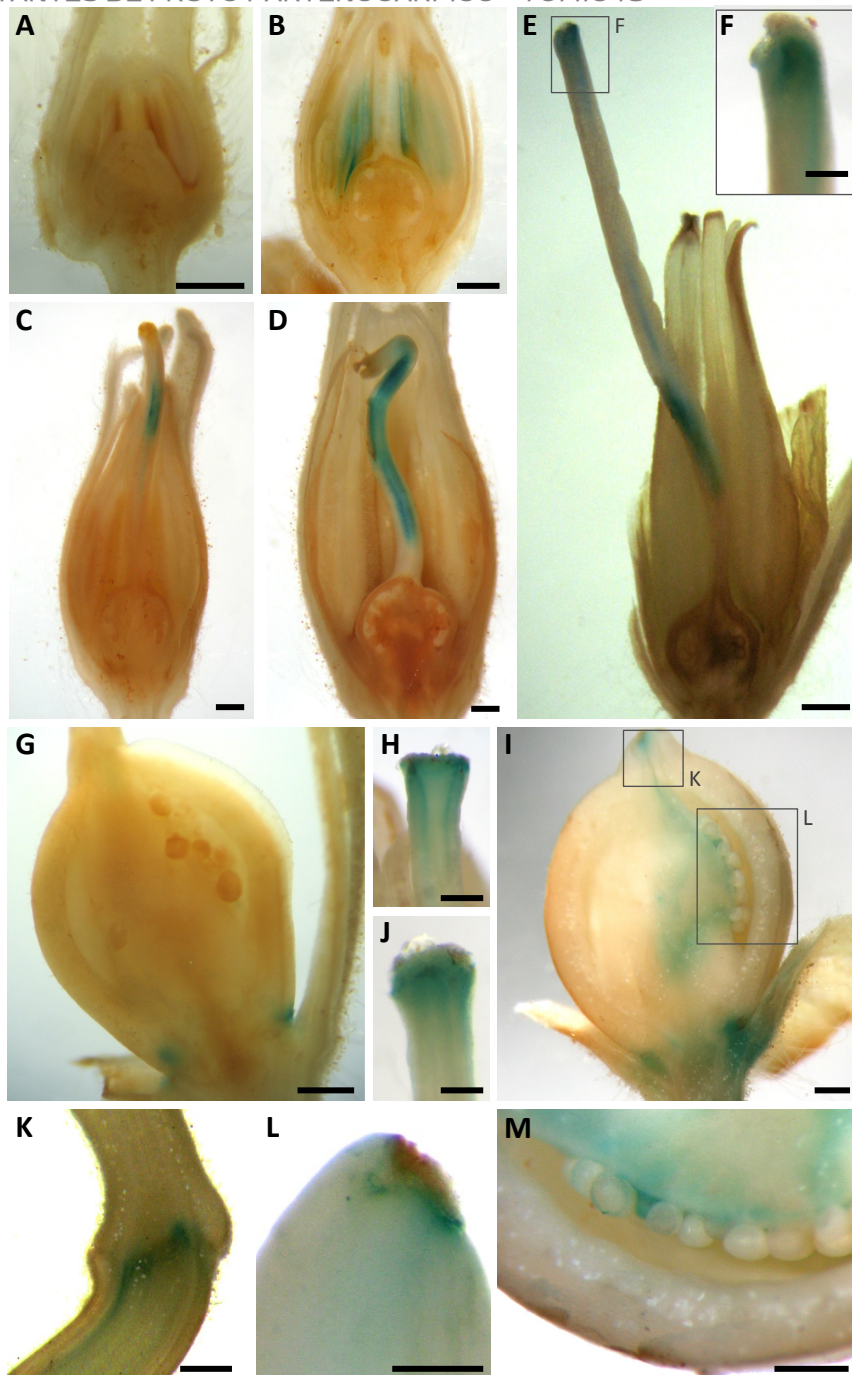


Figura 53. Expresión del delador (*Uida*) en flores de *Tom1648*. A: ausencia de expresión GUS en botón floral de 2,5mm de longitud. B: expresión GUS en botón floral de 4,1mm de longitud. C: expresión GUS en botón floral 1. D: expresión GUS en botón floral 2. E: expresión GUS en flor en preantesis. F: detalle de la expresión GUS en el estigma de la flor en preantesis. G: expresión GUS en ovario de una flor en antesis. H: detalle de la expresión GUS en el estigma de una flor en

antesis. I: Expresión GUS en ovario de una flor de 7 días postantesis. J: detalle de la expresión GUS en el estigma de la flor en postantesis. K: detalle de la expresión GUS en la zona de abscisión del pedicelo de una flor en antesis. L: detalle de la expresión GUS en la zona de abscisión del estilo de una flor de 7 días postantesis. M: detalle de la expresión GUS en el interior del ovario de una flor de 7 días postantesis.

Escala de las barras: A-D, G, I, K-M: 500µm, E: 1mm; F, H y J: 200µm.

pedicelo. Este mismo patrón se reproduce en estadios más avanzados del desarrollo floral (i.e. 7 días post-antesis) observándose adicionalmente expresión del delator en la zona de abscisión del estilo (figura 53L), en la placenta del fruto (figura 53I) y en óvulos (figura 53M).

En frutos de pequeño calibre se detectó expresión GUS en la zona de inserción de los diferentes verticilos florales (figuras 54B y 54E), en la zona en la que se encuentra la cicatriz estilar (figuras 54C y 54F) y en la placenta, más concretamente, en la zona en la que se encuentran los rudimentos seminales (figuras 54A y 54D). Asimismo, a partir de un determinado estadio de desarrollo del fruto (i.e. fruto de 2 cm de diámetro) se detecta expresión del delator en exocarpo (figura 54D).

A partir del estadio de verde maduro se observó un cambio radical en el patrón de expresión del delator, ya que se detectó una tinción GUS intensa y ubicua. Aunque a partir de este estadio de desarrollo también se detecta tinción azul en Moneymaker, la expresión GUS en el mutante parece deberse a la expresión del delator *Uida* y no a la actividad GUS endógena que se detecta en el testigo (figuras 54G-J).

Por lo que respecta a la zona de abscisión del pedicelo, se detectó una intensa expresión GUS en esta zona en todos los estadios de desarrollo del fruto hasta el momento en el que éste se desprende de la inflorescencia (figuras 54K-54M). Conviene indicar que en frutos de Moneymaker en el estadio pintón se detecta una leve tinción azul, pero al igual que comentábamos en el caso de los frutos, la expresión GUS en el mutante parece deberse a la expresión del delator *Uida* y no a esa falsa actividad GUS que se detecta en el testigo (figura 54M).

RESULTADOS

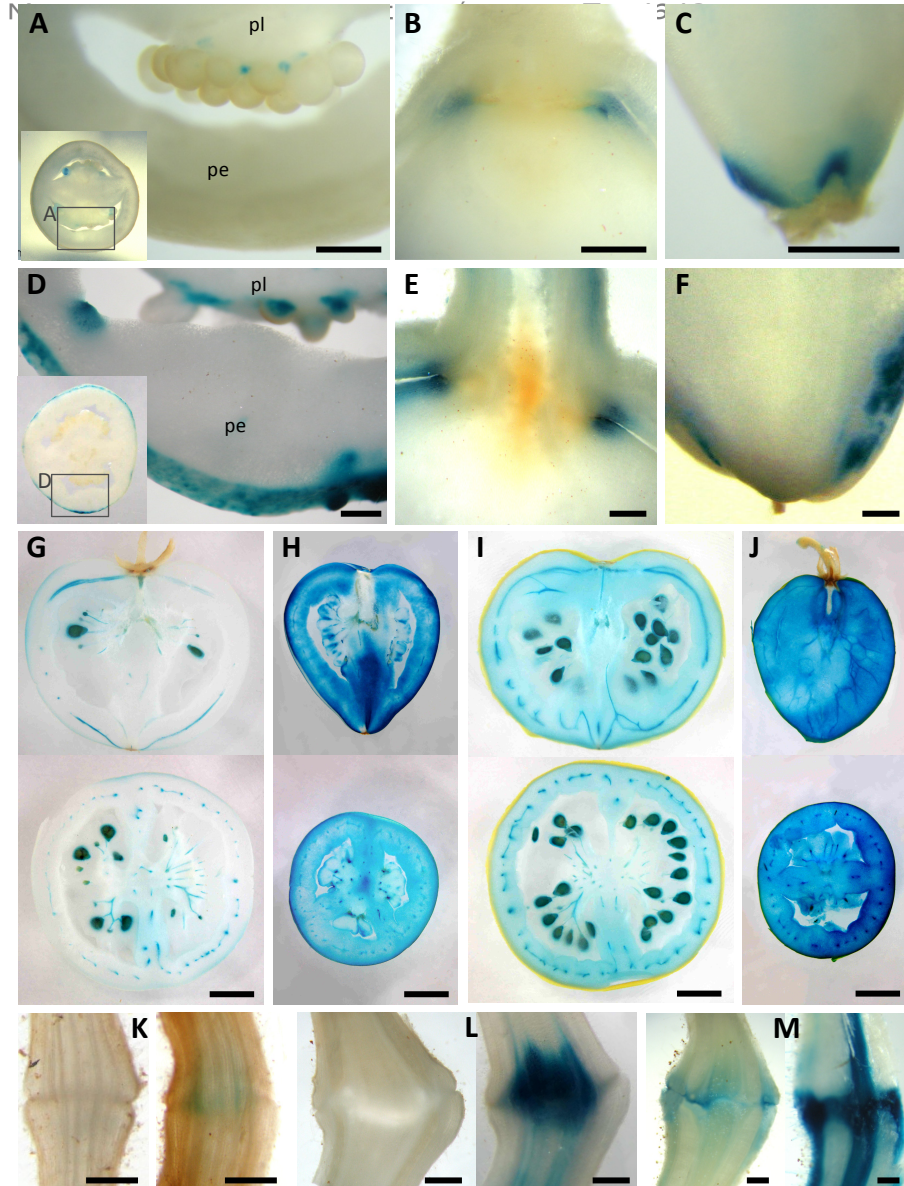


Figura 54. Expresión del delator (*Uida*) en el frutos de *Tom1648*. A-C: expresión GUS en el interior (A), zona de unión del ovario con el pedúnculo (B) y cicatriz estilar (C) de un fruto verde inmaduro de 1,2cm de diámetro. D-F: expresión GUS en el interior y exocarpo (D), zona de unión del ovario con el pedúnculo (E) y cicatriz estilar (F) de un fruto verde inmaduro de 2cm de diámetro. G-H: expresión GUS en la sección longitudinal (arriba) y transversal (abajo) de un fruto verde maduro de Moneymaker (G) y del mutante (H). I-J: expresión GUS en la sección longitudinal (arriba) y transversal (abajo) de un fruto en estadio pintón de Moneymaker (I) y del mutante (J). K-M: detalle de la expresión GUS en zona de abscisión del pedúnculo de frutos de Moneymaker (izda.) y del mutante (dcha.) en estadios de verde inmaduro de 1,2cm de diámetro (K), verde inmaduro de 2cm de diámetro (L) y pintón (M).

pe= pericarpio; pl= placenta.

Escala de las barras: A-C: 500µm, D-F: 1mm; G-J: 1cm; K-M: 500µm.

3.1.4. Corolario

Tom1648 es un mutante dominante cuyos frutos exhiben una morfología cordiforme y no tienen semillas. No obstante, lo más destacable es que los frutos se desprenden por la zona de abscisión del pedicelo cuando alcanzan el estadio de pintón. Es decir, cuando se inicia la maduración del fruto se activa el proceso de abscisión, lo que aporta algunos indicios sobre el papel funcional del gen alterado en el mutante.

Los análisis histológicos indican que tanto la producción de polen como el desarrollo de los óvulos se encuentran alterados, lo que explica los problemas que hemos tenido a la hora de realizar los retrocruces con el WT en ambas direcciones. Por un lado, el mutante exhibe esterilidad masculina, lo que impide la obtención del retrocruce WT x mutante; por otro, los óvulos del mutante se desarrollan en una etapa muy temprana, lo que probablemente explica las dificultades que hemos tenido a la hora de conseguir el retrocruce inverso (mutante x WT). Aún así, la información que hemos obtenidos a través de la caracterización fenotípica e histológica puede ser de gran utilidad para superar las dificultades a la hora de obtener el retrocruce mutante x WT. En principio, este retrocruce se podría lograr mediante polinización *in vivo* en una etapa muy temprana del desarrollo ontogénico de la flor o, alternativamente, mediante técnicas de polinización y fertilización *in vitro*.

El análisis Southern realizado en el laboratorio del Dr. Lozano (Universidad de Almería) reveló la integración de tres copias de T-DNA en el mutante que no están en tándem, sino en posiciones genómicas distintas. Los resultados del análisis de expresión del delator sugieren, además, que uno de los tres insertos podría ser el responsable de las alteraciones que se han observado en el mutante.

3.2. *Tom157*

3.2.1. Descripción de fenotipo mutante

Las plantas se caracterizaron durante varias cosechas en las que se verificó la reproducibilidad de las alteraciones más relevantes del mutante. Además, el cultivo se realizó en diferentes ambientes (i.e. distintos invernaderos), viéndose siempre el mismo fenotipo.

Por lo que respecta al fenotipo, las plantas mutantes exhibían un crecimiento más lento que el WT. Las hojas eran de un color verde más intenso y los folíolos eran más gruesos y de diferente textura y morfología (figuras 55A y 55B). Aunque por su aspecto el mutante compartía algunas similitudes con el fenotipo que presentan las plantas tetraploides tanto *in vivo* como *in vitro* (color verde más intenso, hojas con folíolos más gruesos y de distinta morfología; ver figura 55A y 55E), el análisis mediante citometría de flujo confirmó su naturaleza diploide.

Por lo que respecta a los caracteres de tipo reproductivo, las flores eran morfológicamente idénticas a las del WT (figura 55C y 55D). Tampoco se observaron diferencias en la arquitectura de la inflorescencia.

Los frutos, en cambio, eran completamente distintos a los de Moneymaker. El calibre era significativamente menor y la pigmentación más intensa y oscura (tabla 11, figura 56). Por lo que respecta a la morfología, el índice de forma longitudinal (IFL) de los frutos del mutante fue similar al de los frutos del WT, indicando su valor (en torno a $0,8-0,9 < 1$) que se trataba de frutos ligeramente achatados. El índice de forma transversal (IFT) fue menor, y su valor ($0,89 < 1$) indicó que las secciones transversales de fruto eran ligeramente ovaladas (tabla 11). En su interior, los lóculos carecían por completo de semillas y en ocasiones se encontraban rudimentos seminales (figura 56C). También pudimos comprobar la ausencia de sincronización entre la maduración de los lóculos y el pericarpio. En este sentido, se recolectaban frutos maduros (es decir, de color rojo intenso) con los lóculos de color verde (figura 56C). Los frutos siempre tenían dos lóculos a diferencia de los de Moneymaker que, en ocasiones,

pueden tener 3 lóculos (tabla 11). Además, pudimos comprobar que el pericarpio era más delgado (tabla 11, figura 56B y C).

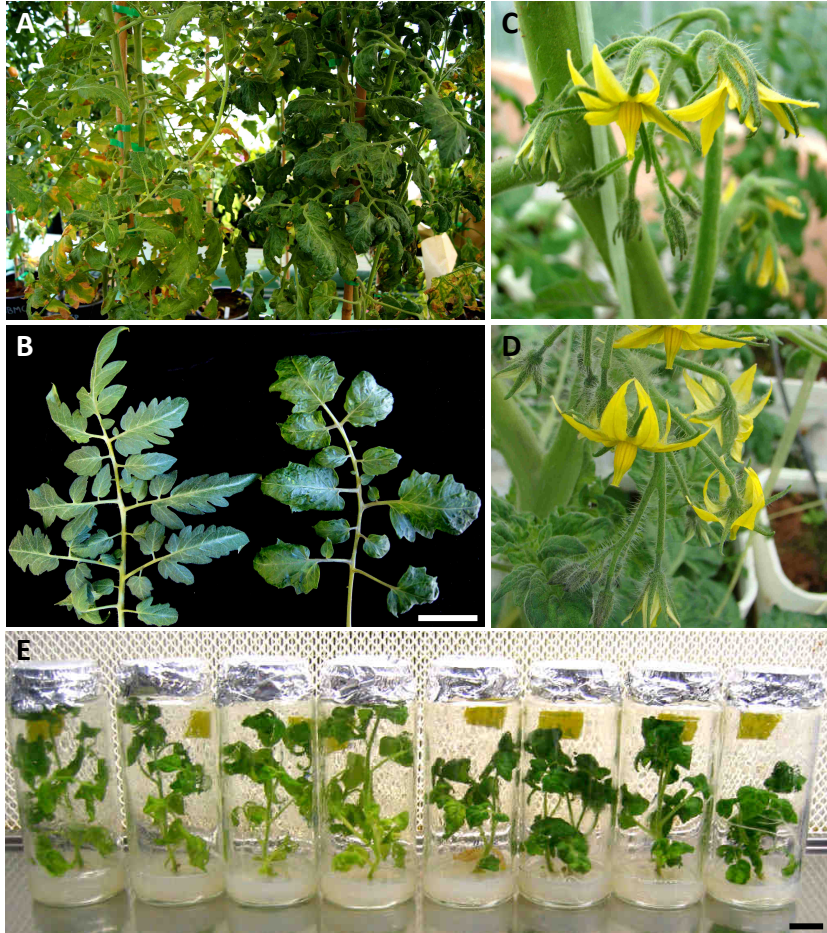


Figura 55. A: plantas de MoneyMaker (izda.) y de *Tom157* (dcha.). B: hoja de MoneyMaker (izda.) y del mutante (dcha.). C, D: inflorescencias de MoneyMaker y del mutante, respectivamente. E: desarrollo *in vitro* de cuatro plantas diploides de MoneyMaker (izda.) y de cuatro plantas tetraploides de MoneyMaker (dcha.). Escala de las barras: B:10cm; E: 2cm.

Tabla 11. Características de los frutos de Moneymaker y de *Tom157*.

Caracteres		Moneymaker	<i>Tom157</i>
Calibre del fruto	Altura (cm)	3,8 ±0,1 ^a (2,9-5)	3,2 ±0,1 ^b (2,7-3,7)
	Diámetro 1 (cm)	4,8 ±0,1 ^a (3,8-6,2)	4,4 ±0,0 ^b (3,9-4,9)
	Diámetro 2 (cm)	4,5 ±0,1 ^a (3,6-5,9)	3,9 ±0,0 ^b (3,4-4,4)
Forma del fruto	IFL	0,81 ±0,01 ^a (0,7-1)	0,87 ±0,02 ^a (0,82-0,95)
	IFT	0,95 ±0,01 ^a (0,87-1)	0,89 ±0,00 ^b (0,84-0,93)
Interior del Fruto	Nº de Lóculos	2,2 ±0,1 ^a (2-3)	2,0 ±0,0 ^a (2-2)
	Pericarpio (cm)	0,74 ±0,02 ^a (0,5-1)	0,35 ±0,01 ^b (0,2-0,5)
	IAP	0,16 ±0,00 ^a (0,13-0,21)	0,09 ±0,00 ^b (0,07-0,12)

Los valores se expresan como la media ± el error estándar. El rango se indica entre paréntesis. La caracterización se llevó a cabo con 31 frutos de Moneymaker y 22 frutos del mutante. Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student).

Diámetro 1= diámetro mayor, Diámetro 2= diámetro perpendicular al diámetro 1, IFL= Índice de forma longitudinal, IFT= Índice de forma transversal, Pericarpio= Anchura del pericarpio, IAP= Índice de anchura del pericarpio. Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student).

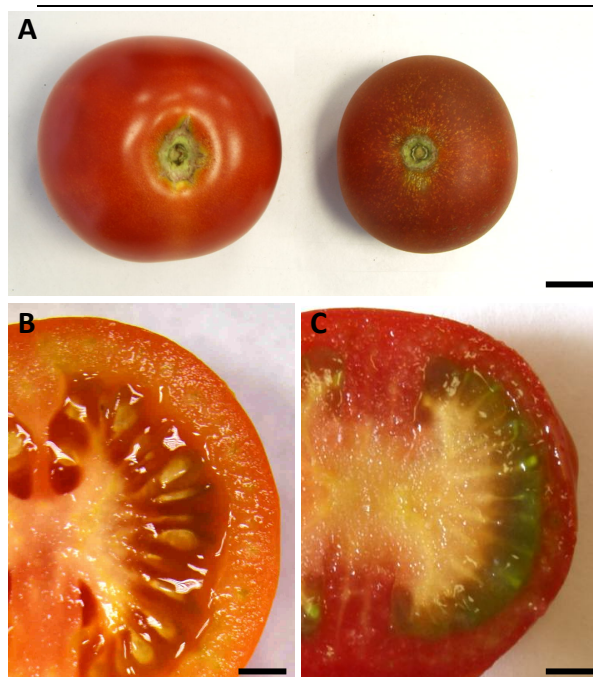


Figura 56. Frutos de Moneymaker (izda.) y del mutante *Tom157* (dcha.). Escala de las barras: A: 1cm; B,C: 0,5cm.

A lo largo de las diferentes cosechas en las que se cultivó el mutante se realizaron cruces con plantas WT (Moneymaker) en ambas direcciones. Sin embargo, no fue factible obtener el retrocruce en ninguna de las dos direcciones.

3.2.2. Análisis de las alteraciones en el desarrollo reproductivo

Habida cuenta de que no habíamos sido capaces de obtener semillas a partir del mutante, ni mediante autofecundación controlada (es decir, llevando a cabo la polinización manual) ni realizando cruces con el WT, decidimos analizar histológicamente los óvulos y las anteras de sus flores.

Previamente, se comprobó si había un desarrollo prematuro del ovario midiendo el calibre de una muestra representativa de ovarios del WT y del mutante en el estadio de antesis. Vimos que no existían diferencias estadísticamente significativas entre el diámetro de los ovarios del WT y del mutante en este estadio del desarrollo floral (tabla 12 y figura 57), lo que indicaba que no se producía un desarrollo prematuro del ovario en este mutante.



Tabla 12. Características del ovario de MoneyMaker y de *Tom157* en estadio de antesis.

Genotipo	Diámetro (mm)	Nº de Carpelos
MoneyMaker	1,87 ± 0,06 ^a	2,4 ± 0,2 (2-4) ^a
<i>Tom157</i>	1,98 ± 0,07 ^a	2,0 ± 0,0 (2-2) ^a

Los valores se expresan como la media ± el error estándar y el rango entre paréntesis. Para cada genotipo, la caracterización se llevó a cabo con 10 flores.

Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student).

Figura 57. Ovario en estadio de antesis de MoneyMaker (izda.) y del mutante *Tom157* (dcha.). Escala de las barras: 500µm.

Para ver si los óvulos exhibían algún tipo de alteración morfológica que permitiera arrojar luz sobre la ausencia de semillas en los frutos del mutante, se realizaron cortes histológicos en flores en diferentes estadios del desarrollo floral. En este análisis, no fuimos capaces de observar diferencias morfológicas entre el ovario o los óvulos del WT y el mutante en los cuatro estadios del desarrollo floral analizados (botón floral 1, 2, preantesis y antesis). La figura 58 ilustra la morfología de parte del ovario de flores

en antesis del WT y del mutante. Como se puede ver, aparentemente no hay diferencias respecto a la morfología de los óvulos entre ambos genotipos.

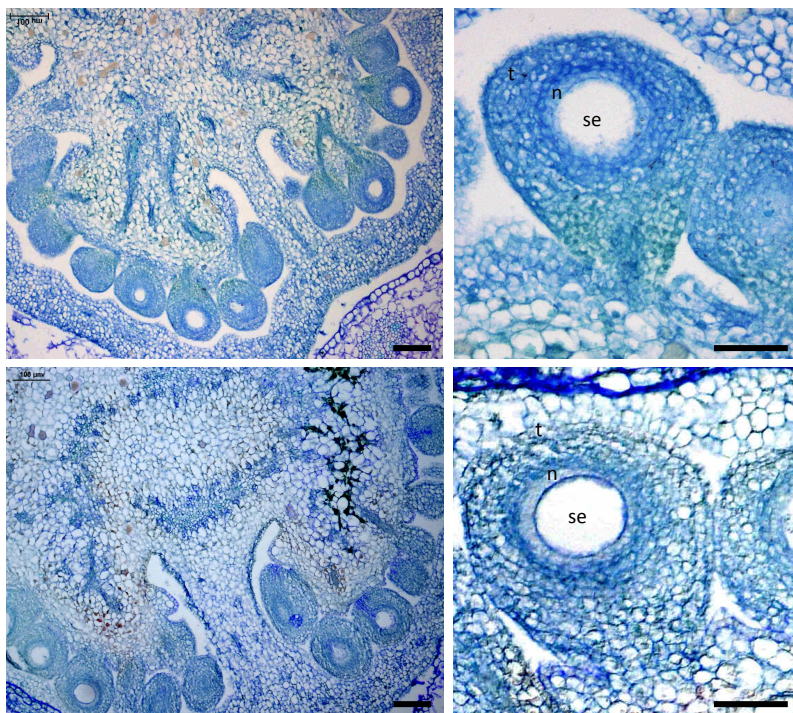


Figura 58. Sección transversal de un ovario en antesis y detalle de los óvulos de MoneyMaker (arriba) y de *Tom157* (abajo).

n= nucela; se= saco embrionario; t= tegumentos del óvulo.

Escala de las barras: izquierda: 100µm, derecha: 50µm.

Cuando se intentaban realizar los cruces utilizando el mutante como donador de polen habíamos apreciado que no éramos capaces de extraer mucho polen de sus flores. Al analizar la viabilidad del polen mediante una tinción con acetato de carmín pudimos comprobar que la cantidad de polen por flor que extraíamos del mutante era menor que la que éramos capaces de extraer a partir de las flores de MoneyMaker (figura 59A vs 59B). Pudimos ver que, a diferencia del WT, más del 50% de los granos de polen del mutante era anómalo, de forma irregular y carente de coloración roja (figura 59C vs 59D). También pudimos comprobar que muchos de los granos de polen aparentemente viables del mutante (sobre la base de su coloración) se encontraban agregados a los granos de polen inviables. Aunque, como se comentaba

anteriormente, la cantidad de polen por flor que extraíamos del mutante era muy escasa, en torno a un 37% (± 7) de los granos parecían viables en contraste con el 98% (± 1) de viabilidad en el WT.

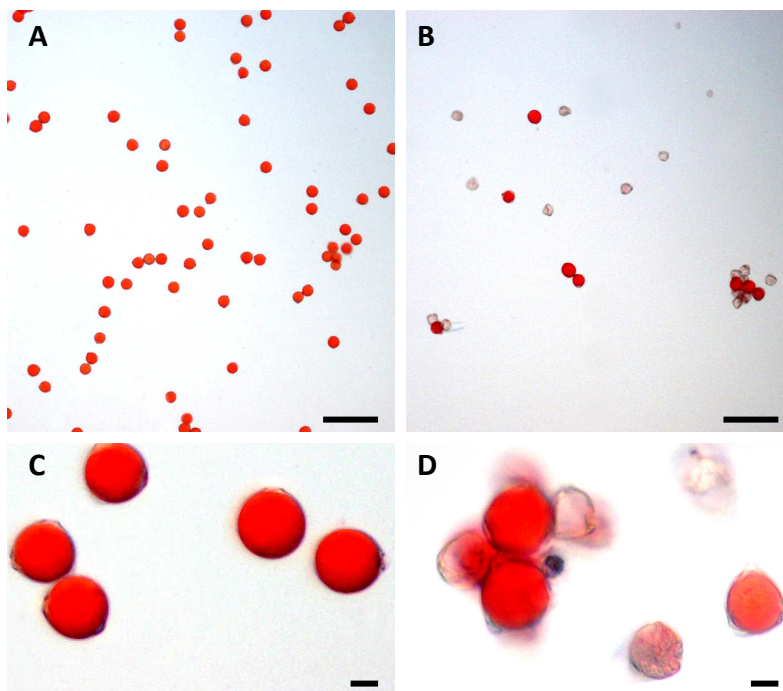


Figura 59. Tinción vital con acetato de carmín de los pólenes de Moneymaker (izda.) y de *Tom157* (dcha.).
Escala de las barras: A y B: 100 μ m, C y D: 10 μ m.

También se analizó mediante cortes histológicos el desarrollo de las anteras y del polen en los estadios de botón floral 1, botón floral 2, preantesis y antesis. Los conos estaminales de las flores del WT y mutante tenían el mismo número de anteras (tabla 13). Sin embargo, el estudio histológico reveló notables alteraciones en la morfología de las anteras del mutante, especialmente en la zona de los tejidos esporógenos (figura 60A vs 60B y 60C). En muchas anteras, los sacos polínicos se encontraban ausentes o eran muy pequeños (ver figuras 60D, 60E, 60F, 60G o 60J) y en otras, los granos de polen parecían inviables (figura 60H vs 60I). Tras analizar las anteras de 11 flores del mutante se pudo ver que el 64% mostraba anomalías de diferente índole y

tan sólo el 36% tenía una morfología aparentemente normal (tabla 13), es decir aproximadamente 2 anteras aparentemente normales de cada 6. No obstante, se observó una cierta variabilidad de esta proporción en cada flor.

Tabla 13. Anteras aparentemente normales (N) y anómalas (A) en 12 flores de Moneymaker y 11 flores de *Tom157*.

Genotipo	MM				<i>Tom157</i>			
	N	A	Total	% N	N	A	Total	% N
Nº de Anteras								
Flor 1	5	0	5	100	1	5	6	17
Flor 2	6	0	6	100	1	5	6	17
Flor 3	6	0	6	100	5	1	6	83
Flor 4	5	0	5	100	4	2	6	67
Flor 5	7	0	7	100	0	6	6	0
Flor 6	6	0	6	100	4	3	7	57
Flor 7	6	0	6	100	1	6	7	14
Flor 8	6	0	6	100	0	6	6	0
Flor 9	7	0	7	100	1	5	6	17
Flor 10	5	0	5	100	4	3	7	57
Flor 11	6	0	6	100	4	2	6	67
Flor 12	6	0	6	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nº de Anteras / Flor			5,9	±0,2^a			6,3	±0,1^a
% de Anteras N/ Flor			100	±0^a			36	±0,1^b

Las medias se expresan como el promedio ± el error estándar.

Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student).

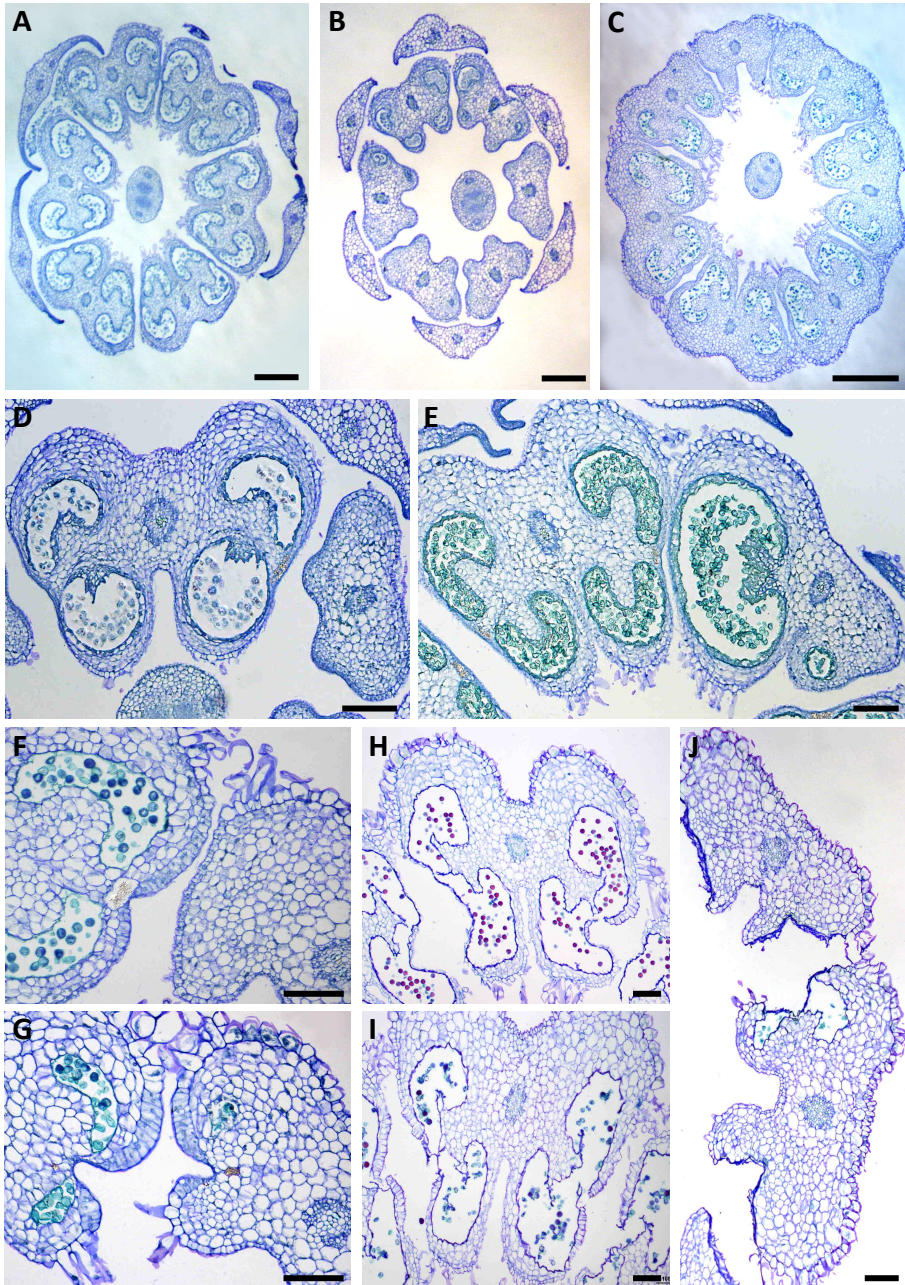


Figura 60. Secciones transversales de anteras en flores de Moneymaker y de *Tom157*. A-B: sección transversal de una flor de Moneymaker (A) y de *Tom157* (B) en estadio de botón floral 1. C) sección transversal de una flor del mutante en estadio de botón floral 2. D-E: detalle de anteras del mutante en estadio de botón floral 1 (D) y botón floral 2 (E). F-G: detalle de los sacos polínicos de las anteras del mutante en estadio de preantesis. H: antera de una flor de Moneymaker en estadio de antesis. I-J: anteras del mutante en estadio de antesis. Escala de las barras: A,B: 200 μ m; C: 500 μ m; D-J: 100 μ m.

Por lo que respecta al tipo de anomalía que presentaban las anteras del mutante, se podía observar desde una atrofia parcial del arqueosporio (i.e. el tejido del esporófito en el que se desarrollan las células madres de las meiósporas o meiocitos) y del tapete (figuras 60E y 60G) hasta la atrofia completa de estos tejidos (figura 60D, F). Con relación al resto de la antera (i.e. epidermis, endotecio, capas intermedias, conectivo o haz vascular) no se observaron cambios apreciables respecto al WT. Así, se pudo observar que la epidermis y el endotecio parecían desarrollarse de forma correcta, toda vez que en el estadio de antesis se producía la apertura de los sacos polínicos (figuras 60I y 60J).

Por lo que respecta al desarrollo del polen, las evidencias fotográficas del análisis histológico parecen indicar que la morfología de los granos de polen del mutante y del WT era similar en el estadio de botón floral 1 (figura 61A vs 61B).

Sin embargo, desde el estadio de botón floral 2, en el mutante se empezaban a observar cambios respecto a MoneyMaker. En esta etapa del desarrollo floral, todos los granos de polen se encuentran en el estadio de microspora libre de calosa en el WT. En el mutante, sin embargo, la mayor parte de los granos exhibían morfologías aberrantes y pigmentaciones más tenues consecuencia probablemente de la menor densidad (figura 61C vs 61D).

En el estadio de preantesis se observaba la misma tónica. En el WT, la mayor parte de los granos de polen eran esféricos y aparecían teñidos de color azul intenso mientras que en el mutante la morfología de la mayor parte de los granos era irregular y parecían más pequeños. Además, los que exhibían una morfología más esférica no estaban completamente pigmentados (figura 61E vs 61F).

En el estadio de antesis los granos que podrían ser viables no eran completamente esféricos y, aunque tenían una coloración purpura similar a la de los granos del WT, la tinción era más difusa (figura 61G vs 61H). Estas observaciones sugieren la posibilidad de que el pequeño porcentaje de los granos de polen que parecen viables en realidad no lo sean y manifiesten problemas a otros niveles (i.e. germinación de polen).

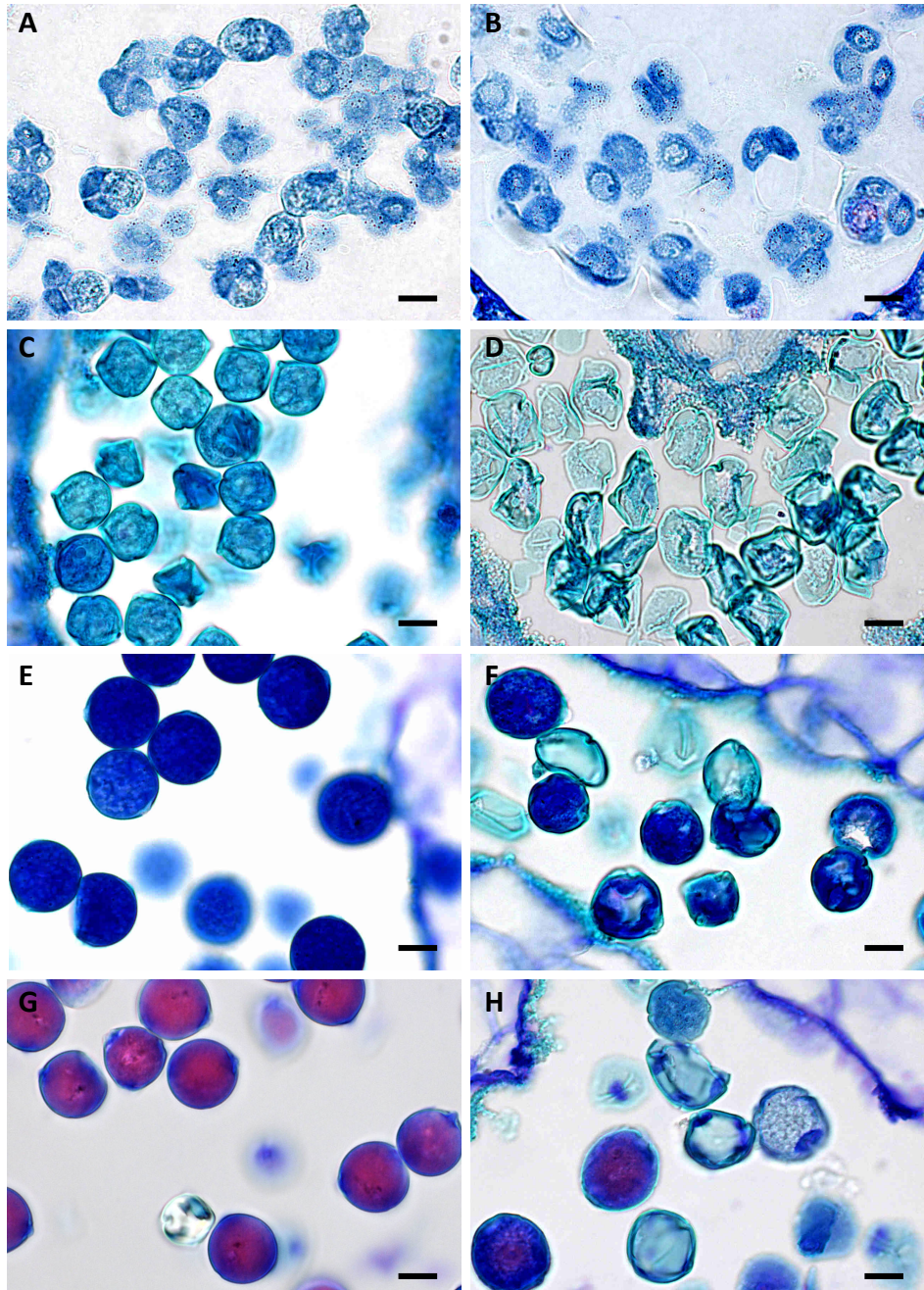


Figura 61. Granos de polen de flores de MoneyMaker (izda.) y de *Tom157* (dcha.) en los estadios de botón floral 1 (A y B), botón floral 2 (C y D), preantesis (E y F) y antesis (G y H). Escala de las barras: 10 μ m.

3.2.3. Análisis de la expresión del gen delator *Uida*

No se observó tinción GUS en ninguno de los tejidos vegetativos (i.e. distintas partes de la hoja, yemas axilares y secciones de tallo) o reproductivos (i.e. flores o frutos en diferentes estadios de desarrollo) que se analizaron. De hecho, tal y como se puede ver en la figura 62, la tinción GUS en fruto maduro del mutante es prácticamente nula mientras que en el WT se observan diferentes regiones teñidas (falsos positivos). Por tanto, caben dos posibilidades: i) que el delator no se exprese por alguna razón (i.e. se encuentre truncado) o ii) que el fenotipo se deba a una mutación de tipo somaclonal.

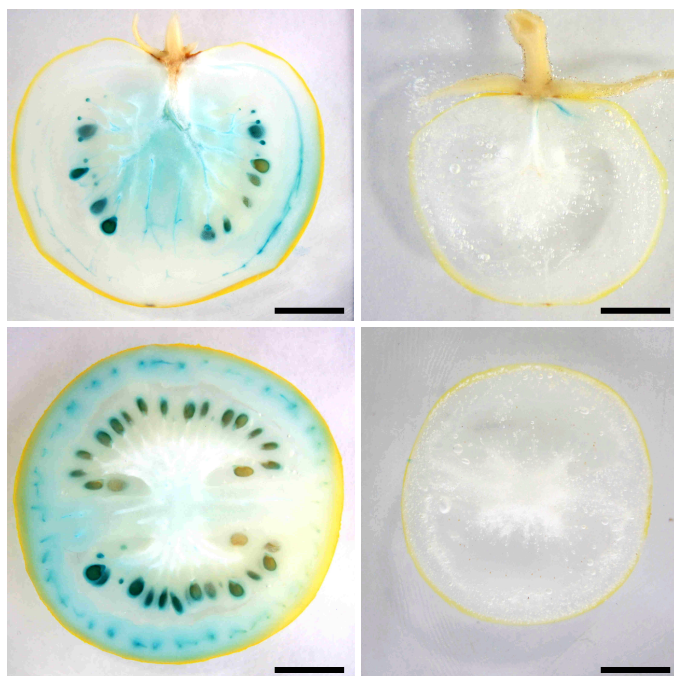


Figura 62. Análisis de la expresión del gen delator (*Uida*) en frutos de MoneyMaker (izda.) y de *Tom157* (dcha.) en estadio rojo maduro. Escala de las barras: 1cm.

3.2.4. Corolario

El mutante *Tom157* se caracteriza por el desarrollo de frutos partenocárpicos y de un color mucho más intenso que los del WT.

Las observaciones sobre los ovarios y óvulos del mutante no explican los problemas que hemos tenido a la hora de intentar conseguir el retrocruce mutante x WT. Por un lado, los ovarios tienen un tamaño similar a los del WT y no experimentan

un cuajado prematuro y, por otro, el análisis histológico no ha revelado ninguna anomalía en los óvulos del mutante. De todas formas, el que no se detecte ninguna anomalía a nivel morfológico no significa que no la haya a nivel funcional.

Las anteras del mutante sí exhiben una serie de alteraciones importantes y lo mismo ocurre con los granos de polen. El porcentaje de polen aparentemente viable es muy bajo y todos los intentos para conseguir el retrocruce WT x mutante han sido infructuosos.

La ausencia de expresión del delator en todos los tejidos analizados del mutante resultó un tanto sorprendente. Desde luego, el mutante podría ser de tipo somaclonal pero el resultado no excluye la posibilidad de que sea de tipo insercional. De hecho, el análisis Southern realizado por el grupo del Dr. Lozano en Almería con una sonda *FA-nptII* (es decir con una parte del gen de secuencia única *FALSIFLORA* y la otra correspondiente al gen marcador) reveló la presencia de un solo inserto. Es posible, por tanto, que el mutante tenga un T-DNA truncado que porta el gen *nptII* intacto (lo que explica la resistencia a la kanamicina) pero que ha perdido una parte o todo el gen *Uida* (lo que explicaría la ausencia de expresión del delator).

Los experimentos de Anchor-PCR realizados también por el grupo del Dr. Lozano han conducido a la amplificación de las secuencias que flanquean al T-DNA. Saliendo por el borde izquierdo (LB) se amplifica una región genómica del cromosoma 9. Se trata de una región que tiene una secuencia muy repetida en el genoma de tomate. Al amplificar por el otro lado se llega a la misma secuencia altamente repetida del cromosoma 9. Además, los resultados de esta amplificación indican que, como sospechábamos, el T-DNA está truncado, ya que ha perdido el borde derecho (RB) y tiene el *Uida* fragmentado.

La situación es complicada porque el T-DNA se ha integrado en medio de una secuencia altamente repetida y, por si fuera poco, el gen más próximo a la región etiquetada se encuentra a 28,45 Kpb. El gen en cuestión codifica una proteína desconocida y la hipótesis de partida es que el T-DNA haya interrumpido algún elemento regulador de este gen.

3.3. *Tom316*

3.3.1. Descripción de fenotipo mutante

El fenotipo del mutante se observó durante varias cosechas en distintas condiciones ambientales (i.e. diferentes invernaderos o épocas). En general, las plantas mutantes no exhibían alteraciones en la arquitectura vegetativa y sus hojas eran similares a las de Moneymaker (figura 63).



Figura 63. Hojas adultas de Moneymaker (izda.) y de *Tom316* (dcha.).
Escala de la barra: 10cm.

Las flores, en cambio, eran diferentes a las del WT. Desde los primeros estadios del desarrollo floral se podía apreciar que los sépalos eran más pequeños que los del WT (figuras 64A y 64C). Los pétalos eran, sin embargo, de mayor calibre, más anchos que los del WT aunque de similar longitud (figura 64B y 64C). También pudimos ver que casi todas las flores tenían la región superior del cono estaminal parcialmente fusionado (figura 64B, 64D, 64E). Además, los extremos de los estambres estaban curvados hacia el exterior.

En estadio de antesis, no se detectaron diferencias en el diámetro o número de lóculos de los ovarios del mutante respecto a los del WT (figura 65, tabla 14).

Los frutos eran más pequeños y carecían de semilla. En su interior, los lóculos eran de menor calibre y contenían mucílago (figura 66). Aunque no se estimó la tasa de cuajado, pudimos apreciar que el número de frutos que se desarrollaban en las plantas mutantes era menor.

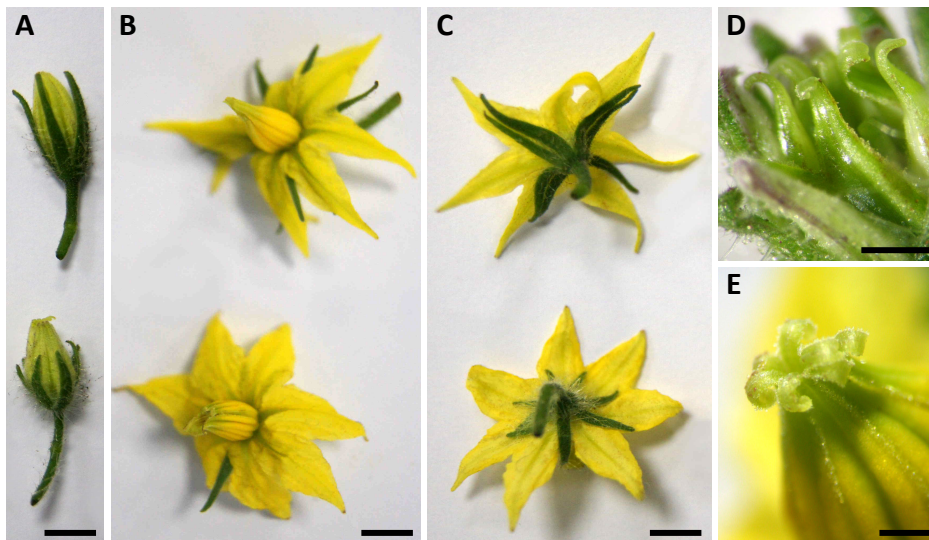


Figura 64. A-C: flores de MoneyMaker (arriba) y de *Tom316* (abajo) en estadio de preantesis (A) y antesis (B y C). D-E: detalle de la parte superior del cono estaminal de una flor del mutante en estadio de botón floral y de antesis, respectivamente. La mayoría de las flores mutantes mostraron una fusión parcial del cono estaminal tal y como se ilustra en las figuras B y E; en ocasiones se observaron conos estaminales muy alterados como en la figura D. Escala de las barras: A-C: 5mm; D y E: 1mm.

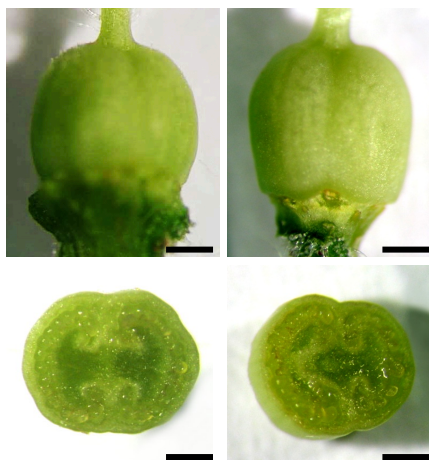


Tabla 14. Características del ovario de MoneyMaker y de *Tom316* en el estadio de antesis.

Genotipo	Diámetro (mm)	Nº de Carpelos
MoneyMaker	1,87 ± 0,06 ^a	2,4 ± 0,2 (2-4) ^a
<i>Tom316</i>	1,84 ± 0,03 ^a	2,6 ± 0,1 (2-3) ^a

Los valores se expresan como la media ± el error estándar y el rango entre paréntesis. La caracterización se llevó a cabo con 10 flores de cada genotipo.

Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$; test de Student).

Figura 65. Ovario de flores en estadio de antesis de MoneyMaker (izda.) y de *Tom316* (dcha.).

Escala de las barras: 500µm.

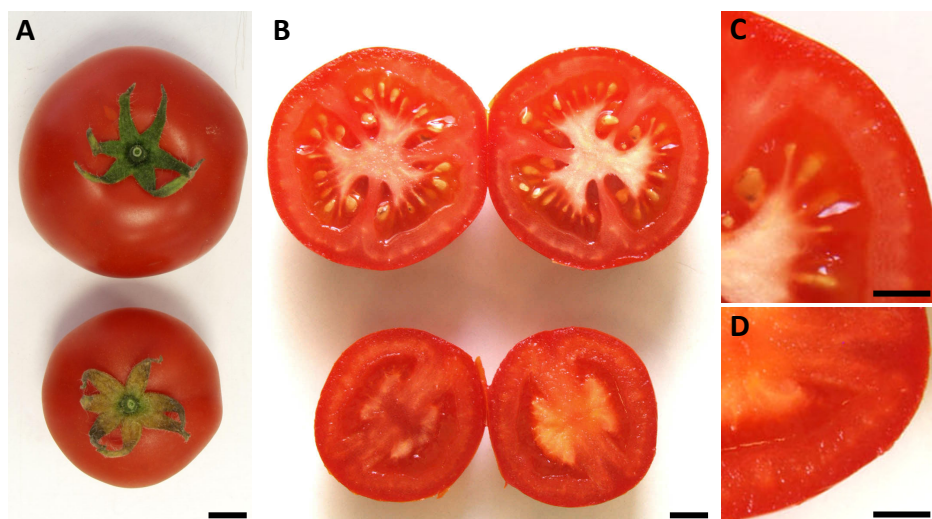


Figura 66. Frutos de MoneyMaker (arriba) y de *Tom316* (abajo).
Escala de las barras: A y B:1cm; C y D: 5mm.

3.3.2. Análisis de las alteraciones en el desarrollo reproductivo

El análisis histológico comparativo de los ovarios del WT y del mutante no reveló diferencias morfológicas entre ambos. Como puede verse en la figura 67, que muestra un corte del ovario en el estadio de antesis, los óvulos del mutante son similares a los del WT.

A continuación, se analizó la viabilidad del polen mediante una tinción con acetato de carmín para ver si una de las razones de que los frutos del mutante no tuvieran semillas se debía a la ausencia de viabilidad del polen. Vimos que una buena parte del polen exhibía una morfología irregular y no se teñía. Sin embargo, casi la mitad de los granos de polen parecían viables, tenían una morfología completamente esférica y estaban perfectamente teñidos (figura 68). En concreto, la tasa de viabilidad del polen del mutante fue de un 44% ($\pm 2\%$) respecto a un 98% ($\pm 1\%$) en el WT.

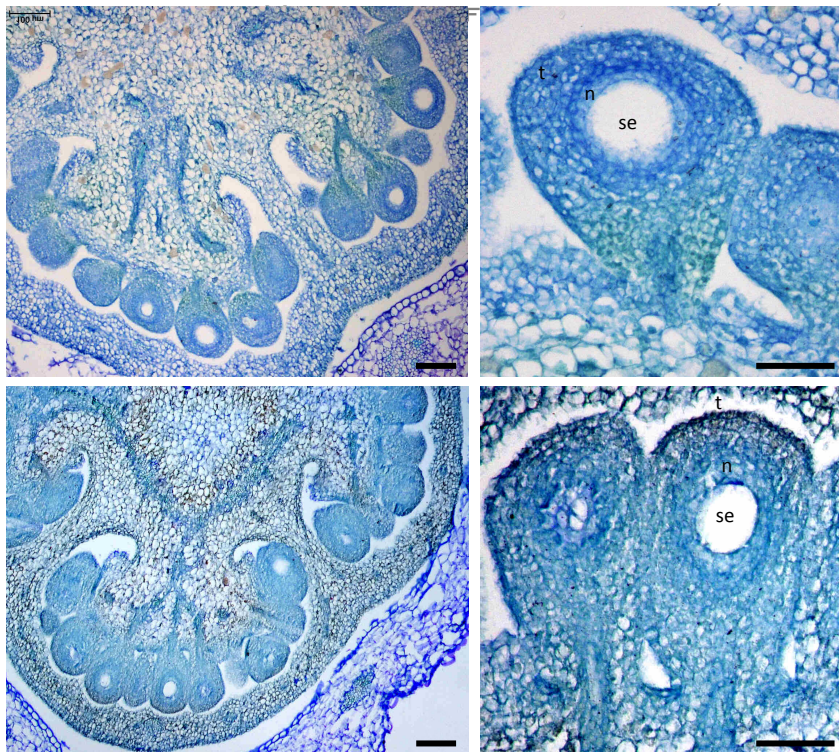


Figura 67. Secciones transversales de ovarios en antesis y detalle de los óvulos de MoneyMaker (arriba) y de Tom316 (abajo).

n= nucela; se= saco embrionario; t= tegumentos del óvulo.

Escala de las barras: izquierda: 100µm, derecha: 50µm.

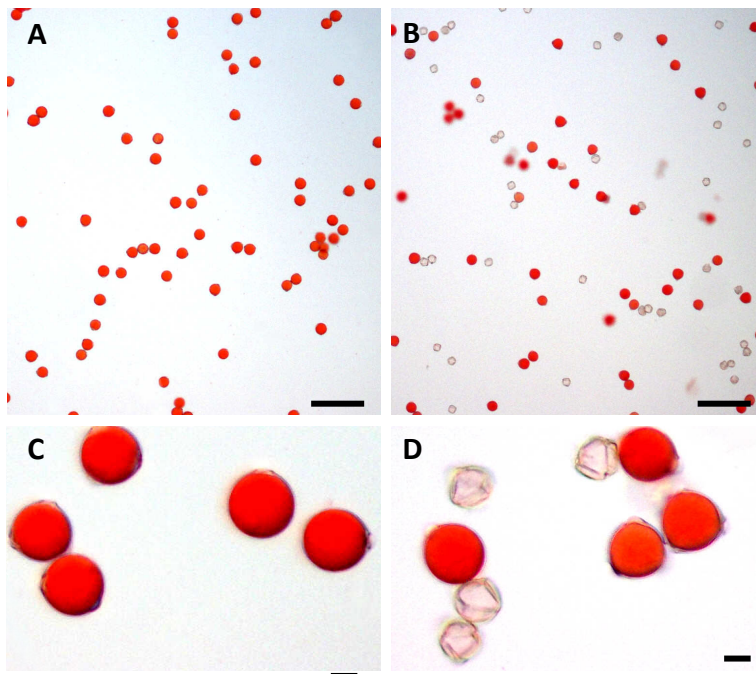


Figura 68. Tinción vital con acetato de carmín de granos de polen de MoneyMaker (izda.) y de Tom316 (dcha.).
Escala de las barras: A y B: 100µm, C y D: 10µm.

En paralelo, se realizó un estudio histológico en flores (desde el estadio de botón floral hasta el de antesis) para tratar de ver con más detalle la morfología de las anteras y del polen en diferentes etapas del desarrollo. Se vio que en muchas de las anteras del mutante se producían malformaciones que explicaban las alteraciones que se habían observado en los conos estaminales. En efecto, en algunas de las preparaciones se podían apreciar fusiones entre dos anteras compartiendo el mismo saco polínico (figuras 69C y 69H). También se vio que algunas de las anteras carecían de sacos polínicos (figuras 69D) y eran mucho más pequeñas (figura 69I). Asimismo, se pudo ver que los sacos polínicos de algunas anteras no contenían prácticamente polen (figuras 69D y 69E) o éste parecía no ser viable (figuras 69G y 69L). Toda esta gama de alteraciones en las anteras podría explicar la ausencia de fusión en algunas zonas del cono estaminal (figura 69E) así como el hecho de que los extremos estuvieran curvados hacia el exterior. Con todo, también se pudo ver que muchas de las anteras eran morfológicamente similares a las del WT (figuras 69A-69G) y contenían polen aparentemente viable (figuras 69J vs 69K).

Figura 69 (ver en la página siguiente). Secciones transversales de flores de Moneymaker y de *Tom316*. A: sección transversal del cono estaminal de una flor de Moneymaker en estadio de preantesis. B-E: secciones transversales del cono estaminal de flores de *Tom316* en estadio de preantesis (B y C) y botón floral 2 (D y E). F: detalle de la antera de Moneymaker en preantesis. G-I: detalle de anteras del mutante en preantesis (G y H) y botón floral 2 (I). J: polen de Moneymaker en estadio de preantesis. K-L: polen del mutante en estadio de preantesis. Escala de las barras: A-C: 500 μ m; D-E: 200 μ m; F-I: 100 μ m; J-L: 10 μ m.

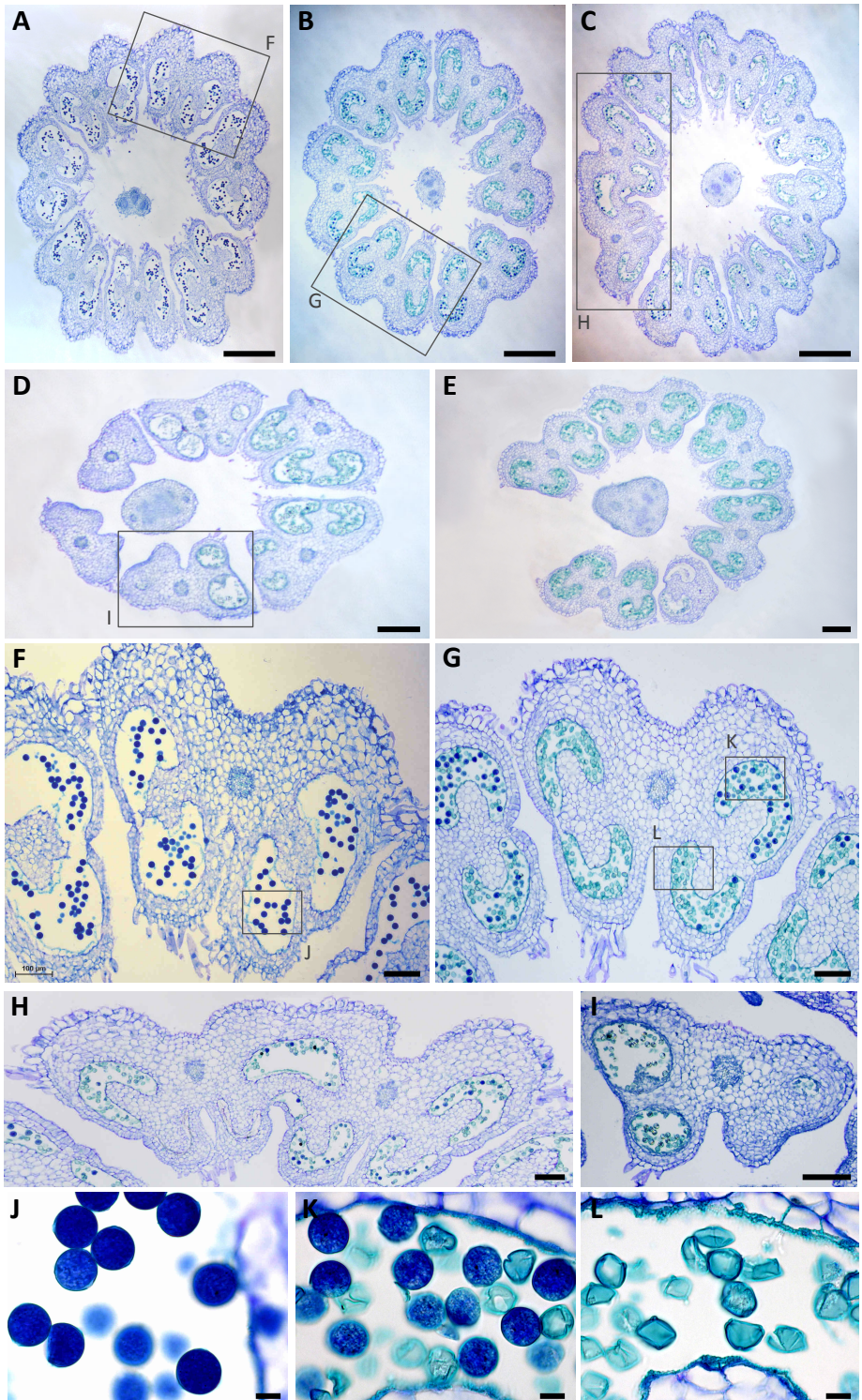


Figura 69. Ver leyenda en la página anterior.

El análisis más detallado a lo largo de diferentes estadios de desarrollo indicó que, en las anteras que no exhibían alteraciones, una proporción considerable del polen exhibía un desarrollo aparentemente normal. En efecto, en la figura 70 se puede ver que en los estadios de botón floral 1 (figuras 70A vs 70B), preantesis (figuras 70E vs 70F) y antesis (figuras 70G vs 70H) la morfología y pigmentación de muchos de los granos de polen del mutante eran similares a las del WT. En el estadio de botón floral 2, sin embargo, los granos de polen en estadio de microspora del WT parecen distintos a los del mutante (figuras 70C vs 70D). Esto puede deberse al hecho de que, en esta preparación, la flor del mutante no se encontrase exactamente en el mismo estadio de desarrollo que la flor del WT, sino en un estadio anterior. Habida cuenta de que las flores se seleccionan por tamaño, es difícil saber el estadio exacto de desarrollo en el que se encuentra el polen. De hecho, en algunas preparaciones del WT en un estadio considerado como botón floral 2 se habían visto granos de polen con la misma morfología y pigmentación que los que se muestran en la figura 70D. Acorde con lo que se vio en las tinciones con acetato de carmín, en casi todas las preparaciones pudimos observar que el porcentaje de granos de polen viable en las preparaciones del WT duplicaba al que se observaba en las del mutante.

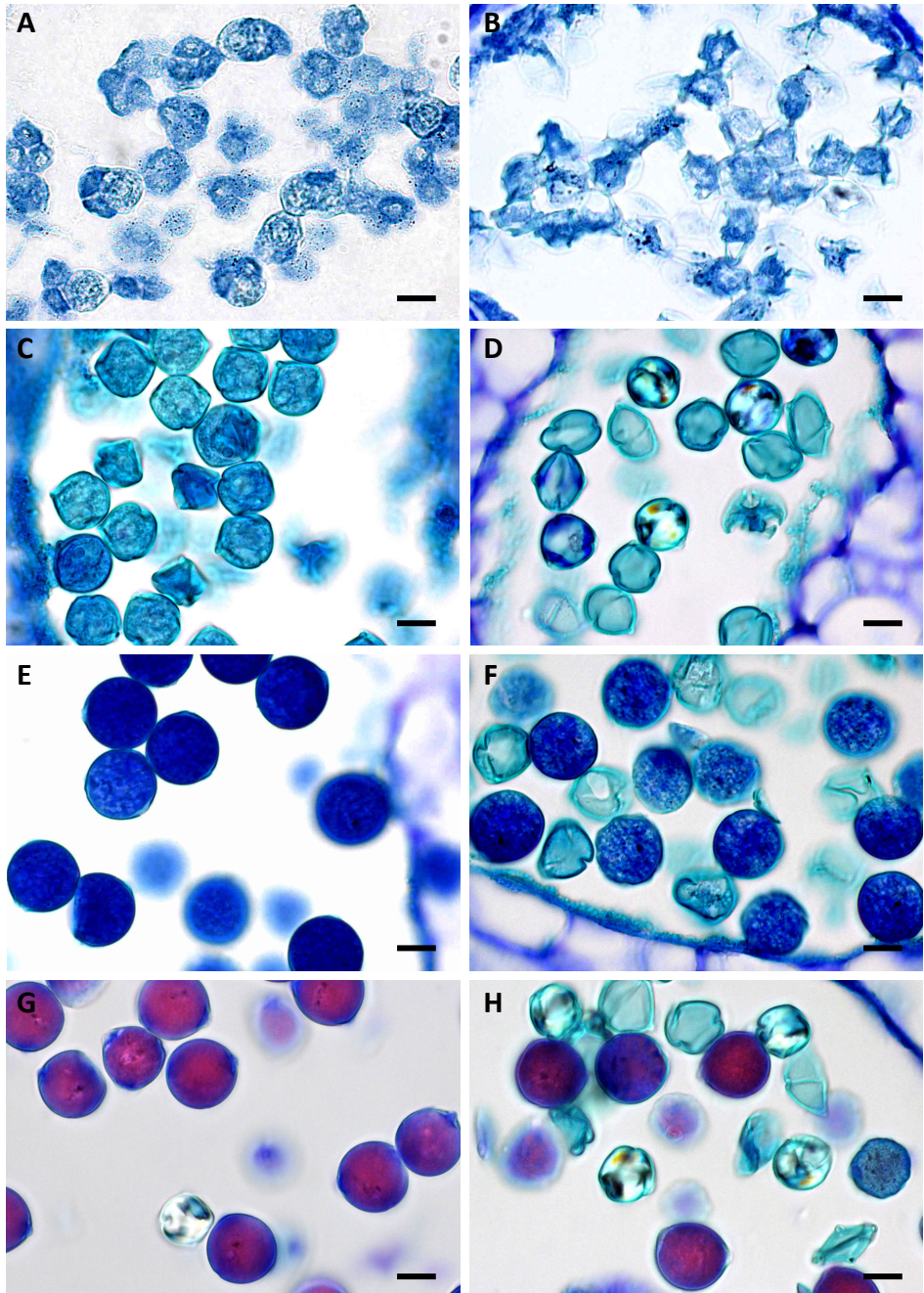


Figura 70. Granos de polen de flores de Moneymaker (izda.) y de *Tom316* (dcha.) en los estadios de botón floral 1 (A y B), botón floral 2 (C y D), preantesis (E y F) y antesis (G y H). Escala de las barras: 10 μ m.

3.3.3. Análisis de la expresión del gen delator *UidA*

Respecto a la expresión del delator, no se observó tinción GUS en ninguno de los tejidos vegetativos que se analizaron (hojas, yemas axilares o secciones de tallo) en consonancia con la ausencia de alteraciones fenotípicas en estas partes de la planta.

Por lo que respecta a las flores, no se detectó expresión del delator en un estadio temprano (figura 71A), pero sí en los restantes estadios del desarrollo floral (figuras 71B-71D). La tinción GUS se encontraba localizada específicamente en los estambres de la flor, lo que podría estar relacionado con las alteraciones morfológicas que exhiben. Los resultados de los análisis de expresión del delator sugieren que las alteraciones en los estambres de las flores del mutante se producen a partir del estadio de botón floral 1.

Las tinciones observadas en frutos del mutante no permiten establecer ninguna relación con el fenotipo observado ya que, si bien en las etapas tempranas del desarrollo (i.e. fruto de 1 cm de diámetro) se detecta una leve expresión del delator en algunas zonas del pericarpio, columela y placenta (figuras 71G y 71I), a partir del estadio verde inmaduro empezamos a visualizar tinciones azules (falsos positivos) en los frutos de Moneymaker que son similares a los que se ven en los frutos del mutante (figuras 71J-71M).

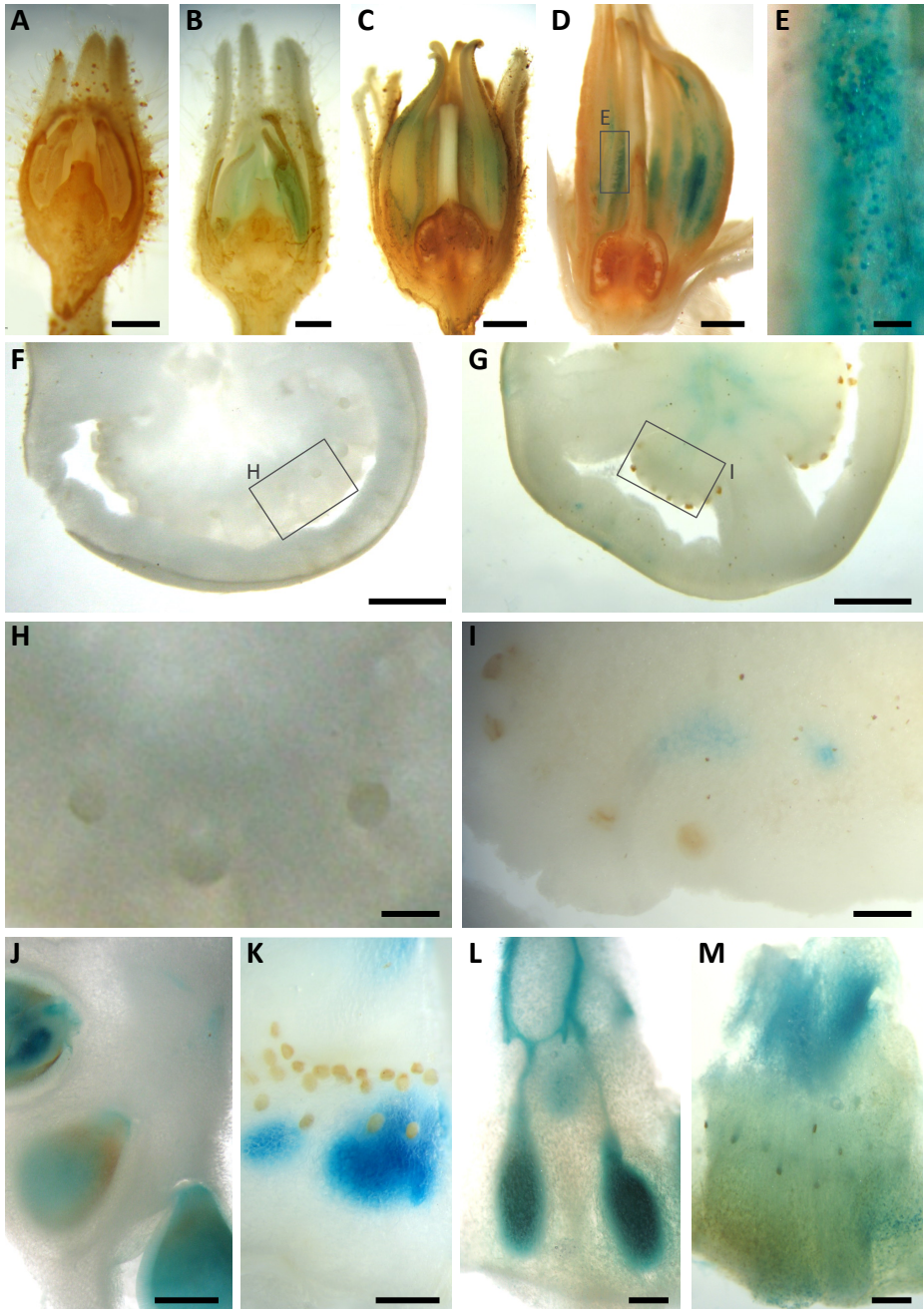


Figura 71. Expresión del gen delator (*UidA*) en *Tom316*. A-E: expresión GUS en flores en estadios de botón floral temprano (A), botón floral 1 (B), botón floral 2 (C) y antesis (D y E). F-I: expresión GUS en frutos de 1cm de diámetro de MoneyMaker (F y H) y del mutante (G e I). Expresión GUS en el interior del lóculo de frutos en estadio verde inmaduro de 3cm de diámetro (J y K) y rojo maduro (L y M) de MoneyMaker (J y L) y del mutante (K y M). Escala de las barras: A,B,H,I: 500µm, C,D,J-M: 1mm; E: 100µm; F,G: 2mm.

3.3.4. Análisis genético de la descendencia procedente del cruce entre el mutante y el WT

Habida cuenta de la ausencia de semillas en los frutos del mutante, para realizar el análisis genético en la descendencia se realizaron cruces entre el mutante y el WT en ambas direcciones. Acorde con las observaciones previas, que indicaban que un cierto porcentaje del polen parecía viable y que, desde un punto de vista morfológico, no se detectaban alteraciones en los óvulos, no tuvimos problemas para obtener semillas de cruce en ambas direcciones. Para la caracterización del fenotipo, se cultivaron 8 plantas procedente del cruce en el que se utilizó el mutante como receptor de polen ($M_{\text{♀}} \times WT_{\text{♂}}$) y 10 plantas de cruce en la dirección contraria ($WT_{\text{♀}} \times M_{\text{♂}}$). Cuando las plantas crecieron y comenzaron a desarrollar frutos, se evaluó el tipo de fruto de cada planta. Vimos que los frutos de las 18 plantas tenían semilla, es decir, ninguna de las plantas exhibía el fenotipo mutante. Conviene mencionar que tampoco se había visto previamente el característico fenotipo de las flores.

Para detectar la presencia o ausencia de T-DNA decidimos evaluar la resistencia/sensibilidad a la kanamicina de cada una de las plantas. Aunque no se había realizado el Southern y por tanto desconocíamos el número de copias de T-DNA del mutante, éste era resistente a la kanamicina, por lo que, al menos, debía contener una copia. De ser así, la segregación de las descendencias de ambos cruces se ajustaría a una distribución $1 \text{ kan}^{\text{R}} : 1 \text{ kan}^{\text{S}}$.

Para evaluar la resistencia o sensibilidad a la kanamicina se reintrodujeron yemas axilares *in vitro*. Cuando estas yemas se desarrollaron, el ápice meristemático se cultivó en medio de enraizamiento suplementado con 100 mg/l de kanamicina. Se vio que de las 8 plantas del cruce $M_{\text{♀}} \times WT_{\text{♂}}$, 7 eran resistentes a la kanamicina y una era sensible. Por lo que respecta a las 10 plantas del cruce $WT_{\text{♀}} \times M_{\text{♂}}$, todas resultaron ser resistentes a la kanamicina.

Los resultados parecen indicar que el mutante contenía más de una copia de T-DNA. En concreto, si el mutante tuviera 2 copias de T-DNA, la segregación de la progenie del cruce se ajustaría a una distribución $3 \text{ kan}^{\text{R}} : 1 \text{ kan}^{\text{S}}$, si tuviera 3 insertos

se ajustaría a una distribución $7kan^R : 1 kan^S$, si tuviera 4 se ajustaría a una distribución $15kan^R : 1 kan^S$, y si tuviera 5 se ajustaría a una distribución $31kan^R : 1 kan^S$. Obviando la dirección del cruce, de las 18 plantas analizadas, 17 fueron resistentes a la kanamicina y 1 sensible. La prueba de Pearson (χ^2) indica que no hay motivos para dudar de cualquiera de las cuatro segregaciones (3:1, 7:1, 15:1 o 31:1), lo que indica que el mutante podría tener 2, 3, 4 o 5 copias de T-DNA (tabla 15).

Tabla 15. Análisis de la χ^2 para segregaciones de la resistencia a kanamicina de 3:1 (2 insertos), 7:1 (3 insertos), 15:1 (4 insertos) o 31:1 (5 insertos) en la población de las 18 plantas de retrocruce de *Tom316*.

	kan^R	kan^S
Valores observados	17	1
Valores esperados (3:1) $\chi^2 = 3,63$ ($<\chi^2_{1 g.l. (5\%)} = 3,84$)	13,5	4,5
Valores esperados (7:1) $\chi^2 = 1,12$ ($<\chi^2_{1 g.l. (5\%)} = 3,84$)	15,43	2,57
Valores esperados (15:1) $\chi^2 = 0,01$ ($<\chi^2_{1 g.l. (5\%)} = 3,84$)	16,88	1,12
Valores esperados (31:1) $\chi^2 = 0,35$ ($<\chi^2_{1 g.l. (5\%)} = 3,84$)	17,44	0,56

En definitiva, los datos de los que disponemos son insuficientes como para emitir una hipótesis plausible. Necesitaríamos conocer el número de insertos del mutante y evaluar una población de cruce más amplia con el objetivo de afinar en el ajuste de las segregaciones. Asimismo, convendría realizar Southern en las plantas del cruce. En conjunto, los datos permitirían saber si existe algún T-DNA que, por la razón que sea, no se transmite a la descendencia, lo que explicaría la ausencia de fenotipo en las plantas de las progenies de ambos retrocruces.

3.3.5. Corolario

Tom316 es una mutación dominante que conduce al desarrollo de frutos sin semilla a pesar de que sus flores producen una cierta cantidad de polen viable. El mutante no manifiesta alteraciones relevantes en el desarrollo vegetativo.

Tanto el éxito de los cruces entre el mutante y el wild-type en ambos sentidos, como los análisis histológicos revelaron que parte de los dos tipos de gametofitos es funcional en el mutante, aunque el cono estaminal de la flor del mutante suele presentar anomalías estructurales. En ese sentido, el análisis del patrón de expresión del gen delator *UidA* podría indicar que estas alteraciones se producen a partir del estadio de botón floral 1.

El análisis de las progenies de retrocruce no nos permitió inferir acerca del número de insertos T-DNA presentes en la TG1 ni de la copia responsable de la mutación. No obstante, a la vista del fenotipo presentado por los individuos de estas poblaciones, pensamos que la ausencia de fusión del cono estaminal podría estar relacionada con la partenocarpia de los frutos.

3.4. Tom497

3.4.1. Descripción de fenotipo mutante

El fenotipo mutante se vio durante varias cosechas y en diferentes condiciones medioambientales (i.e. distintos invernaderos).

A lo largo de los dos o tres primeros meses de cultivo no se detectaban alteraciones en el desarrollo vegetativo. Sin embargo, a partir de ese momento, el mutante comenzó a exhibir síntomas de senescencia. En efecto, las hojas que se desarrollaban eran de menor calibre y tenían un color verde más pálido con secciones cloróticas (figura 72). Estos



Figura 72. Hojas de Moneymaker (izda.) y de Tom497 (dcha.).

Escala de la barra: 10cm.

caracteres se iban intensificando a medida que la planta crecía.

El patrón de desarrollo de las flores era similar al de las hojas, ya que dependía de la edad de la planta. En efecto, durante los primeros dos o tres meses de cultivo, a lo largo de los cuales se desarrollaron dos o tres inflorescencias, las flores del mutante eran de similar tamaño y morfología que las del WT (figura 73A). Durante este periodo, los ovarios de estas flores en el estadio de anthesis eran de similar calibre a los de Moneymaker (tabla 16A). Sin embargo, desde el momento en el que se observaron los síntomas de senescencia en las plantas mutantes, las flores que se desarrollaron fueron diferentes. En efecto, eran flores de menor calibre, exhibían longistilia y, con frecuencia, el cono estaminal no se encontraba fusionado (figura 73B). Además, y en consonancia con el tamaño de la flor, sus ovarios eran de menor calibre que los de Moneymaker (tabla 16B).



Figura 73. Flores de MoneyMaker (izda.) y de *Tom497* (dcha.). A: flores de las primeras inflorescencias (plantas de 2-3 meses). B: flores de las últimas inflorescencias (plantas de 4-5 meses).

Escala de la barra: 1cm.

Tabla 16. Características de los ovarios de MoneyMaker (WT) y del mutante *Tom497* (M) en flores en antesis de plantas de 2-3 meses (A) y 4-5 meses (B).

Genotipo		Diámetro (mm)	Carpelos (nº)
A	WT	1,89 ± 0,04 ^a	2,1 ± 0,1 (2-3) ^a
	M	1,99 ± 0,08 ^a	2,4 ± 0,2 (2-4) ^a
B	WT	1,95 ± 0,05 ^a	2,1 ± 0,1 (2-3) ^a
	M	1,67 ± 0,04 ^b	2,3 ± 0,3 (2-3) ^a

Los valores se expresan como la media ± el error estándar y el rango entre paréntesis. De cada genotipo se caracterizaron 10 flores.

Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student).

Una característica común de todas las flores del mutante era la ausencia de polen, al menos aparentemente. Durante las diferentes cosechas, se realizaron cruces con plantas WT (MoneyMaker) en ambas direcciones. Sin embargo, sólo se obtenía descendencia de cruce cuando se utilizaba el mutante como receptor de polen y en ningún caso cuando se utilizaba el mutante como donador de polen. Tras visualizar estambres de flores en antesis en la lupa nos dimos cuenta de la poca cantidad de polen que se vislumbraba en la zona de dehiscencia de la antera (figura 74), lo que sugería la existencia de anomalías en el desarrollo o la producción de polen.

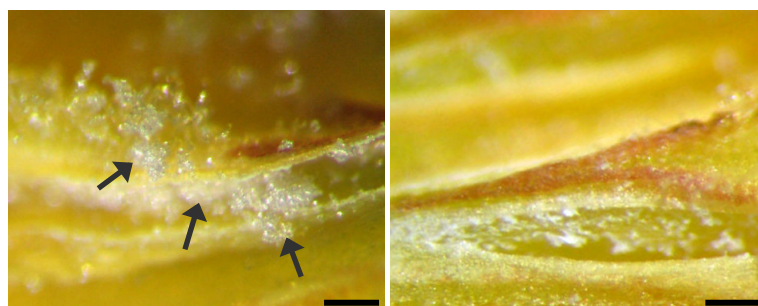


Figura 74. Detalle de la zona de dehiscencia en una antera de una flor en antesis de MoneyMaker (izda.) y de *Tom497* (dcha.).

Las flechas indican granos de polen.

Escala de las barras: 200µm.

Por lo que respecta a los frutos, eran de un calibre sensiblemente menor y carecían de semilla. Una característica común de todos los frutos del mutante fue el tamaño de la placenta, considerablemente mayor que la de los frutos de Moneymaker (figura 75). El pericarpio de los frutos parecía ser, por el contrario, más delgado. En los lóculos de los frutos, que contenían mucílago, se observaban claramente rudimentos seminales. La presencia de estos rudimentos seminales sugiere que los frutos son estenospermocárpicos, pero la ausencia aparente de polen no se ajusta a esta conclusión preliminar porque, al menos en principio, se asume que la estenospermocarpia implica un proceso de fertilización normal seguido del aborto de las semillas inmaduras.

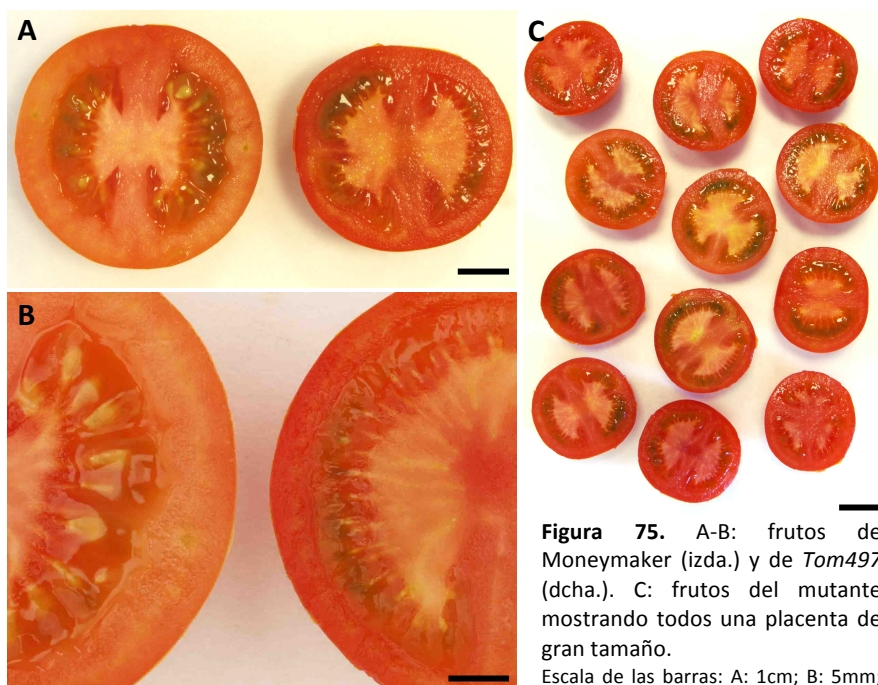


Figura 75. A-B: frutos de Moneymaker (izda.) y de *Tom497* (dcha.). C: frutos del mutante mostrando todos una placenta de gran tamaño.
Escala de las barras: A: 1cm; B: 5mm; C: 2cm.

Los caracteres diferenciales de estos frutos se analizaron de manera más exhaustiva en comparación con los del WT. En promedio, los frutos del mutante pesaban significativamente menos que los del WT (tabla 17). Por lo que respecta a la forma del fruto, el índice de forma longitudinal (IFL) fue similar en los frutos del WT y del mutante, indicando su valor (en torno a $0,8 < 1$) que se trataba de frutos

ligeramente achatados. El índice de forma transversal (IFT) fue también similar, y su valor cercano a la unidad indicó que las secciones transversales de fruto eran prácticamente circulares (tabla 17). Por lo que se refiere al interior del fruto, tanto los frutos del WT como del mutante tenían en torno a 2 lóculos y, como se comentaba anteriormente, el pericarpio de los frutos del mutante resultó ser más delgado que el de los frutos WT (tabla 17).

Tabla 17. Características de los frutos de Moneymaker y del mutante *Tom497*.

Característica		MM		<i>Tom497</i>	
	Peso (g)	51,8±3,6 ^a	(21,2-107,5)	30,4±2,1 ^b	(20,3-38,8)
Calibre del fruto	Altura (cm)	3,9±0,1 ^a	(2,9-5)	3,3±0,1 ^b	(2,8-3,5)
	Diámetro 1 (cm)	4,8±0,1 ^a	(3,8-6,2)	4,0±0,1 ^b	(3,4-4,5)
	Diámetro 2 (cm)	4,5±0,1 ^a	(3,6-5,9)	3,7±0,1 ^b	(3,3-4,1)
Forma del fruto	IFL	0,81±0,01 ^a	(0,7-1)	0,82±0,02 ^a	(0,75-0,92)
	IFT	0,95±0,01 ^a	(0,87-1)	0,91±0,02 ^a	(0,83-0,97)
Interior del fruto	Nº de Lóculos	2,2±0,1 ^a	(2-3)	2,3±0,2 ^a	(2-3)
	Pericarpio (cm)	0,74±0,02 ^a	(0,5-1)	0,50±0,04 ^b	(0,3-0,8)
	IAP	0,16±0,00 ^a	(0,13-0,21)	0,12±0,01 ^b	(0,08-0,19)

Los valores se expresan como la media ± el error estándar. El rango se indica entre paréntesis. La caracterización se llevó a cabo con 31 frutos de Moneymaker y 10 frutos del mutante. Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student).

Diámetro 1= diámetro mayor, Diámetro 2= diámetro perpendicular al diámetro 1, IFL= Índice de forma longitudinal, IFT= Índice de forma transversal, Pericarpio= Anchura del pericarpio, IAP= Índice de anchura del pericarpio.

Aunque en este mutante no se estimó la tasa de cuajado de fruto, se pudo observar que a partir del desarrollo de la tercera o cuarta inflorescencia, lo que coincidía con la aparición de los síntomas de senescencia, cuajaban muchos frutos (figura 76).



Figura 76. Una inflorescencia de *Tom497* en la cual todas las flores han dado lugar a frutos.

3.4.2. Análisis de las alteraciones en el desarrollo reproductivo

Como se ha comentado anteriormente, sobre la base de las observaciones que se habían realizado en la lupa, las flores del mutante parecían carecer de polen. Decidimos analizar la viabilidad del polen mediante una tinción con acetato de carmín. Como nos ocurría cuando tratábamos de cruzar con el WT, la cantidad de granos de polen que éramos capaces de extraer de cada flor mutante era muy escasa. Los pocos granos de polen extraídos tenían una morfología irregular y no se teñían, y sólo ocasionalmente se observaba algún grano de polen teñido (figuras 77B). Sin embargo, los granos que se teñían exhibían protuberancias a lo largo de la superficie que sugerían la existencia de alteraciones estructurales (figura 77D). Por esta razón, a pesar de exhibir una tinción aparentemente normal, pensamos que estos granos de polen no eran realmente viables.

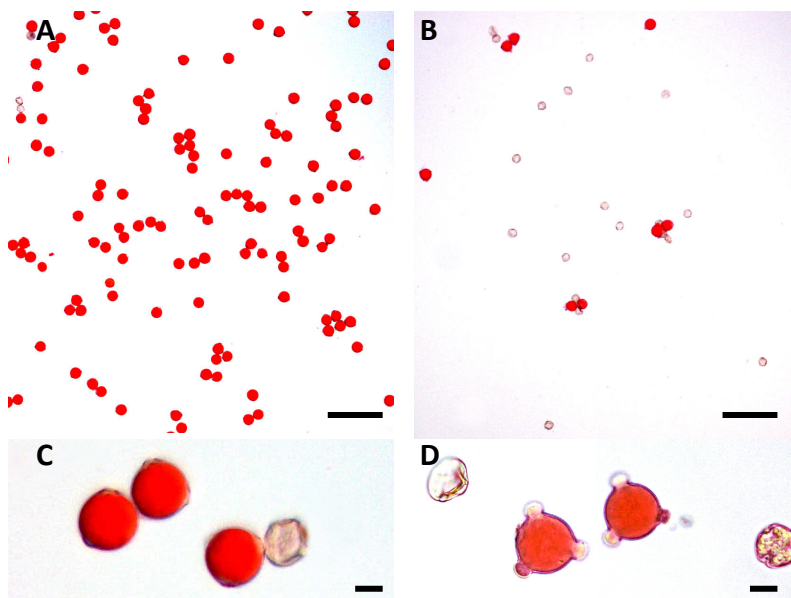


Figura 77. Tinción vital con acetato de carmín de los granos de polen de Moneymaker (izda.) y de *Tom497* (dcha.)
 Escala de las barras: A y B: 100 μ m, C y D: 10 μ m.

Para observar con mayor detalle en qué momento se producían las alteraciones en los granos del polen del mutante, realizamos cortes histológicos en distintos estadios del desarrollo floral (botón floral 1, botón floral 2, preantesis y antesis) en las flores del mutante que presentaron un tamaño wild-type. Desde el estadio de botón floral 1, observamos que los sacos polínicos del mutante tenían menor tamaño que los del WT y contenían menos polen (figura 78). A partir del estadio de botón floral 2, también se pudo ver una reducción del tamaño de la antera (figuras 78B-78D vs 78F-78H). Las observaciones al microscopio parecían indicar que el menor tamaño de la antera se debía, principalmente, a un menor calibre de los sacos polínicos; no observándose reducciones importantes en el resto de los tejidos de la antera (ver figura 78). También pudimos ver la correcta apertura de los sacos polínicos en el estadio de antesis.

Por lo que respecta al desarrollo del polen, no fuimos capaces de observar diferencias entre el mutante y el WT en el estadio de botón floral 1, que corresponde a una etapa de microspora envuelta en calosa (figuras 78I vs 78M). Sí que se observaron diferencias a partir del estadio de botón floral 2. En esta etapa de desarrollo floral, los granos de polen del WT, a pesar de ser más o menos irregulares, comienzan a adquirir una morfología más o menor esférica. Los del mutante, sin embargo, eran más irregulares y parecían estar vacíos (figura 78N). A partir de este estadio de desarrollo, y a diferencia de lo que ocurre en el WT (figuras 78J-78I), no se observaron cambios de morfología o pigmentación en los granos de polen del mutante, lo que sugiere que el desarrollo del polen se detenía antes de que alcanzara la etapa de microspora libre (figuras 78N-78P).

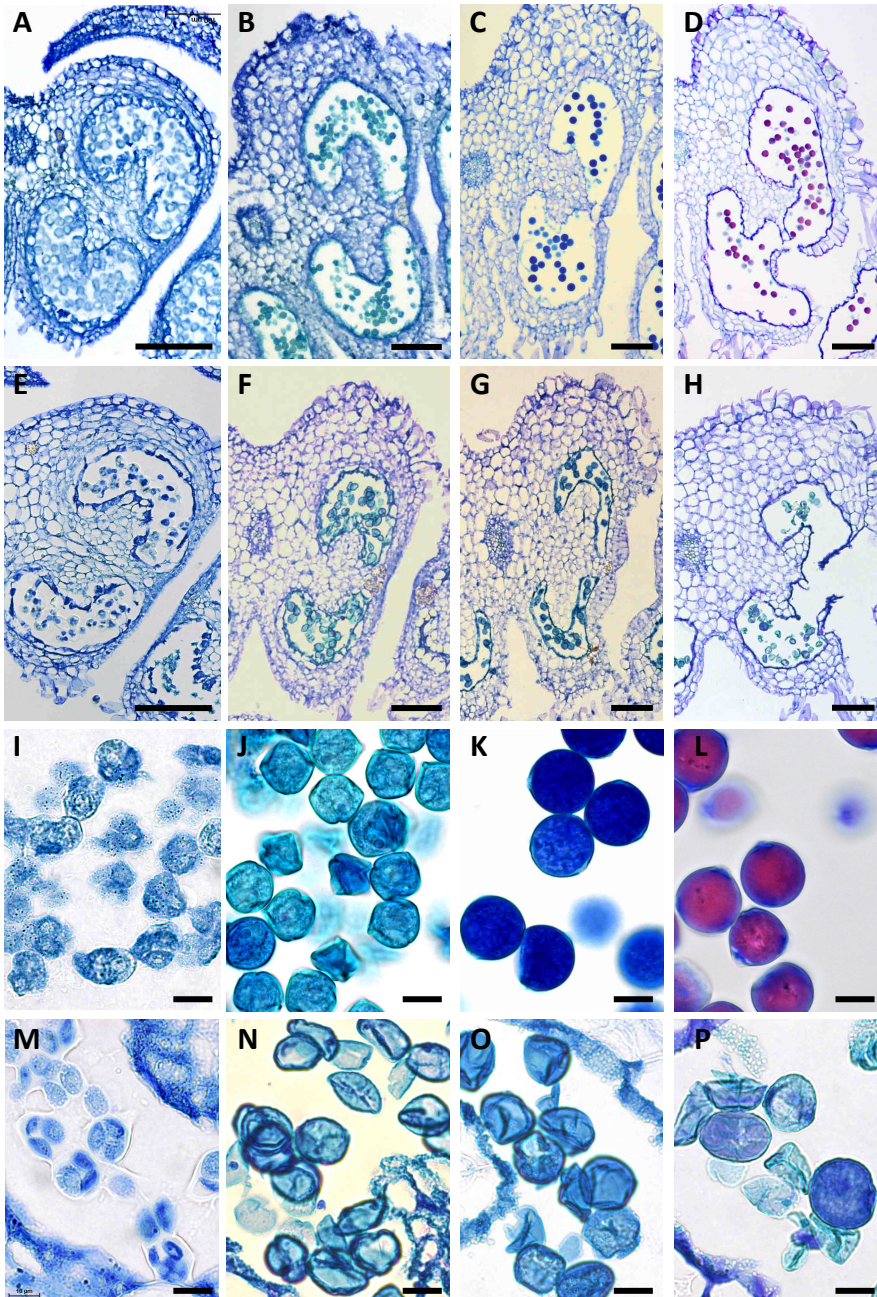


Figura 78. Histología de anteras de Moneymaker (A-D) y de *Tom497* (E-H) en los estadios de botón floral 1 (A y E), botón floral 2 (B y F), preantesis (C y G) y antesis (D y H). Polen de Moneymaker (I-L) y del mutante (M-P) en los estadios de botón floral 1 (I y M), botón floral 2 (J y N), preantesis (K y O) y antesis (L y P). Escala de las barras: A-H: 100 μ m; I-P: 10 μ m.

El análisis histológico del ovario no reveló diferencias entre el WT y el mutante en los diferentes estadios de desarrollo que se analizaron. Tal y como se puede ver en la figura 79, que muestra un corte del ovario en el estadio de antesis, los óvulos del mutante son, con relación a su morfología, similares a los del WT.

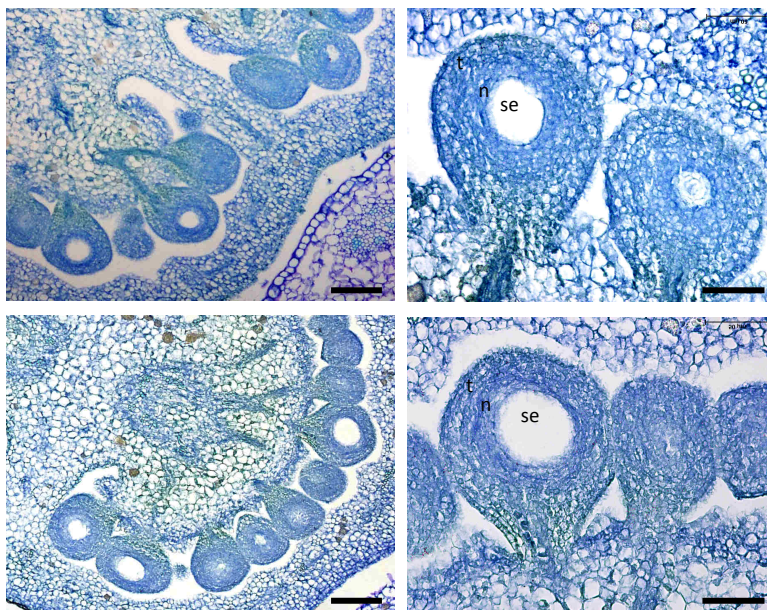


Figura 79. Secciones transversales de ovarios en antesis y detalle de los óvulos de Moneymaker (arriba) y de *Tom497* (abajo).

n= nucela; se= saco embrionario; t= tegumentos del óvulo.

Escala de las barras: izquierda: 100 μ m, derecha: 50 μ m.

3.4.3. Análisis de la expresión del gen delator *UidA*

Pudimos observar que el delator se expresaba en algunos de los tejidos vegetativos que se analizaron. En concreto, se detectó tinción GUS en segmentos de tallo o en las regiones en las que se encuentran las yemas axilares (figura 80). Sin embargo, nunca se observó expresión del delator en hojas, ni en las que exhibían senescencia ni en las que carecían de estos síntomas. Por consiguiente, no se pudo establecer un patrón de expresión del delator relacionado con la presencia o ausencia de síntomas de senescencia.

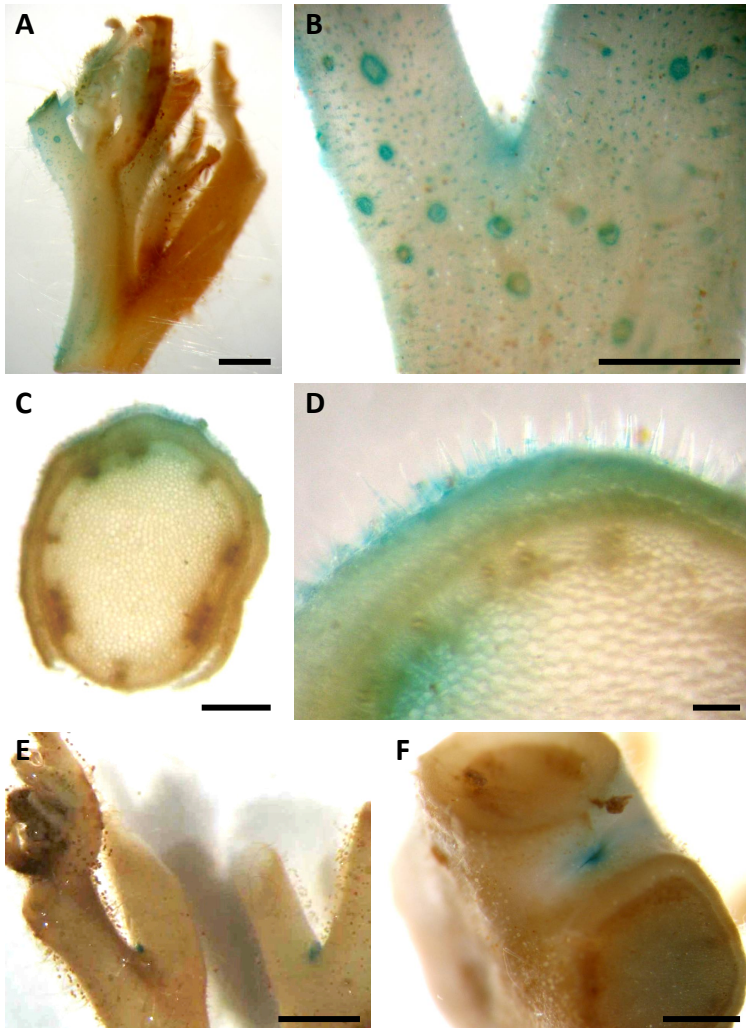


Figura 80. Expresión del gen delador (*UidA*) en diferentes órganos o tejidos vegetativos de *Tom497*. A: expresión GUS en ápice. B: detalle de la expresión GUS en tallo. C: expresión GUS en la sección transversal de un tallo joven. D: detalle de la expresión GUS en la sección transversal del tallo joven. E: expresión GUS en yemas axilares. F: detalle de la expresión GUS en yemas axilares. Escala de las barras: 1mm.

Por lo que respecta a la flor, se detectó expresión del delador en diferentes partes del pistilo a lo largo de todas las etapas del desarrollo floral (figura 81). En efecto, se detectó una intensa tinción GUS en las paredes del ovario y en la placenta, especialmente en las etapas más tempranas del desarrollo (figuras 81A, 81B, 81E, 81F y 81G). Asimismo, se detectó expresión del delador en los óvulos y en el estigma de la flor. Por lo que respecta a otras partes de la flor, se observó tinción GUS en pétalos (figuras 81A-81D) y en el pedicelo de la flor (figura 81N) pero nunca en estambres.

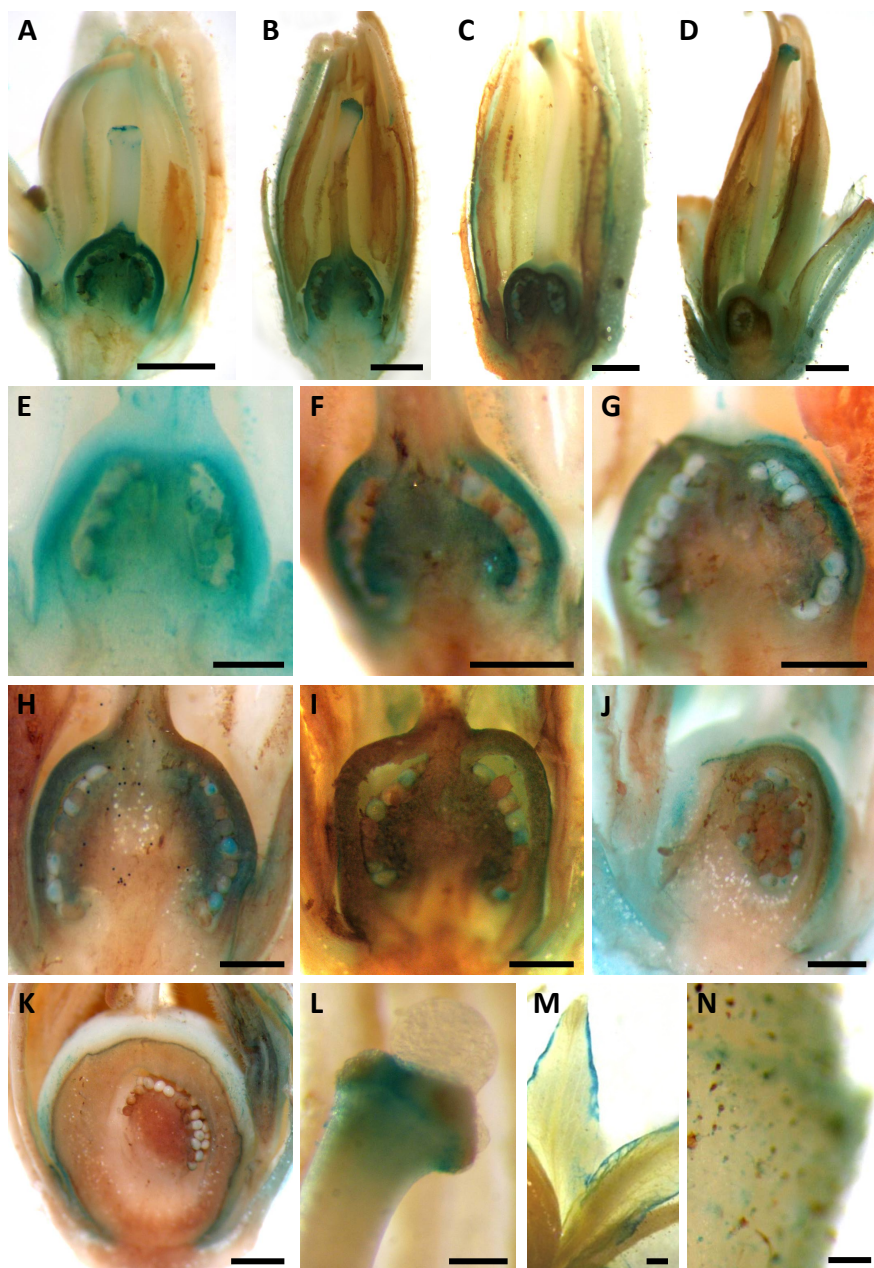


Figura 81. Expresión del gen delator (*UidA*) en flores de *Tom497*. A-D: expresión GUS en flores en estadio de botón floral 1 (A), botón floral 2 (B), preantesis (C) y antesis (D). E-K: expresión GUS en ovario de flores en estadio de botón floral temprano (E), botón floral 1 (F), botón floral 2 (G), preantesis (H), antesis (I), 2 días postantesis (J) y 7 días postantesis (K). L: expresión GUS en el estigma de una flor en estadio de 2 días postantesis. M: expresión GUS en los pétalos de una flor en antesis. N: detalle de la expresión GUS en el pedicelo de una flor de 7 días postantesis.

Escala de las barras: A-D,K,M: 1mm; E,L,N: 200 μ m; F-J: 500 μ m.

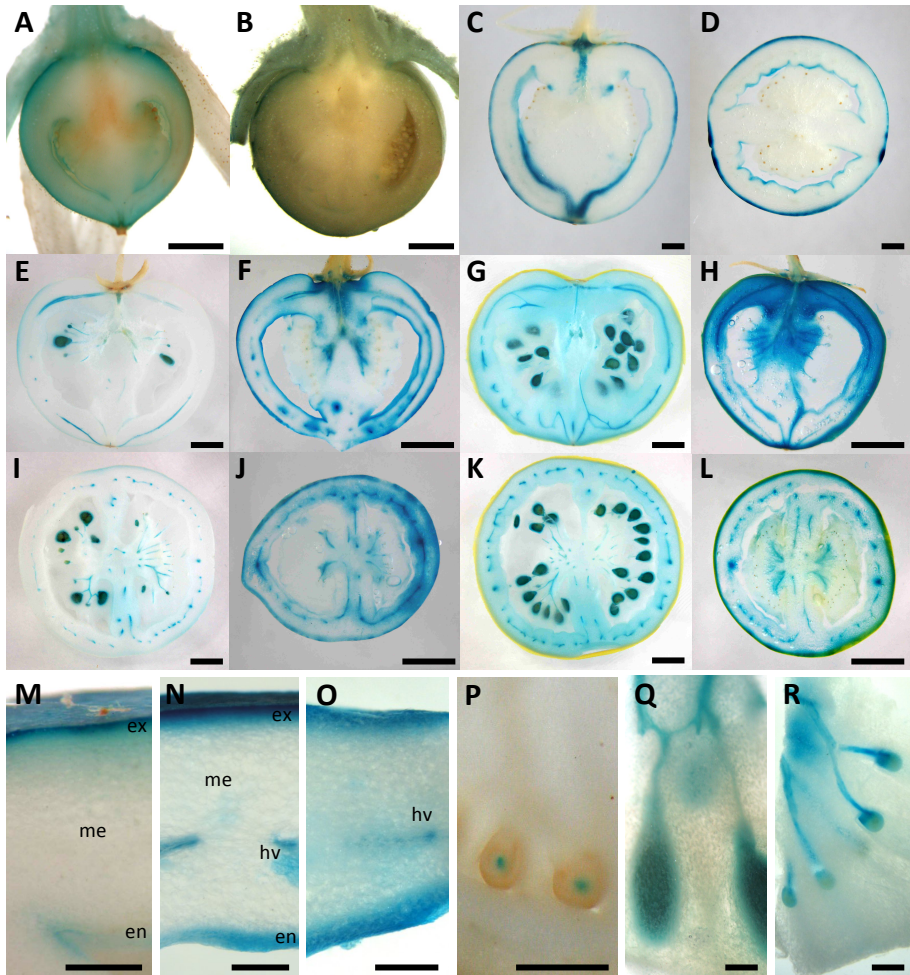


Figura 82. Expresión del gen delator (*Uida*) en frutos de *Tom497*. A-D: expresión GUS en frutos de 0,5cm (A), 1cm (B) y 2,5cm (C-D). Expresión GUS en frutos verde maduro de Moneymaker (E e I) y del mutante (F y J). Expresión GUS en frutos en estadio pintón de Moneymaker (G y K) y del mutante (H y L). M-N). Detalle de la expresión GUS en el pericarpio de frutos del mutante de 2,5cm (M) y Verde Maduro (N). O: detalle de la expresión GUS en el septo de un fruto verde maduro del mutante. P: expresión GUS en rudimentos seminales de frutos del mutante de 1cm. Q: expresión GUS en semilla de Moneymaker. R: expresión GUS en rudimentos seminales de frutos del mutante en estadio verde maduro.
en= endocarpio; ex= exocarpio; hv= haz vascular; me= mesocarpio.
Escala de las barras: A-D: 2mm; E-L: 1cm; M-R: 1mm.

La expresión del delator también se detectó en todos los estadios de desarrollo del fruto (figura 82). En los primeros estadios de desarrollo (i.e. fruto de 0,5 cm de diámetro), la tinción GUS se manifestó en las capas superficiales del pericarpio y en los rudimentos seminales (figura 82A). Como se puede ver en la figura 82, a medida que el

fruto se iba desarrollando la tinción GUS era más intensa en diferentes partes del fruto (i.e. todo el pericarpio, placenta y rudimentos seminales). Sin embargo, el hecho de que los frutos del WT también exhibieran una tonalidad azul en la prueba histoquímica (falsos positivos) a partir de la etapa verde maduro no nos permitió establecer un patrón de expresión del delator asociado a la mutación.

3.4.4. Análisis genético de la descendencia procedente del cruce entre el mutante y el WT

Acorde con los resultados presentados anteriormente acerca de la ausencia de polen viable en el mutante, se obtuvieron semillas procedentes del retrocruce utilizando el mutante como receptor de polen ($M^{\text{♀}} \times \text{WT}^{\text{♂}}$). Habida cuenta de que se trata de una mutación dominante, en la descendencia del cruce cabría esperar una segregación 1 : 1 (1 planta mutante : 1 planta WT), asumiendo que la mutación está promovida por la alteración de un simple gen. No obstante, los análisis Southern que se realizaron en Almería en el laboratorio del Dr. Rafael Lozano (UAL) indican que el mutante contiene dos insertos de T-DNA. Así, la segregación del T-DNA en la progenie del cruce debería ajustarse a una distribución 3 : 1 (3 plantas con T-DNA : 1 planta sin T-DNA). En la figura 83 se propone el modelo teórico si uno de los 2 T-DNA integrados fuese responsable de la mutación.

Figura 83. Cruce entre un mutante dominante con 2 copias de T-DNA y una planta WT. Segregación genotípica, fenotípica (asumiendo que una de las copias de T-DNA promueva una mutación dominante) y presencia o ausencia de T-DNA en la progenie resultante del cruce.

TG1 (M) $A^m aBb$	(x)	WT aabb
↓		
Genotipo	Fenotipo	T-DNA (+ / -)
$A^m aBb$ 1/4	Mutante 2/4	+
$A^m abb$ 1/4	Mutante	+ 3/4
aaBb 1/4	WT	+
aabb 1/4	WT 2/4	- 1/4

A y B representan los 2 T-DNAs.

A promueve la mutación dominante (A^m) que da lugar al desarrollo de frutos sin semilla.

Para llevar a cabo el análisis genético de la mutación, se cultivaron 14 plantas procedentes del cruce entre el mutante y Moneymaker. Cuando las plantas comenzaron a dar frutos, se vio que todos presentaban un calibre similar a Moneymaker y tenían semilla, es decir, no exhibían el carácter mutante. Tampoco se vio en ninguna de las plantas el fenotipo de senescencia. Para detectar la presencia o ausencia del T-DNA se evaluó la resistencia/sensibilidad a la kanamicina de cada una de las plantas. En principio, asumíamos que las dos copias de T-DNA contendrían un *nptII* funcional y que no se encontrarían en tándem. De ser así, la progenie se ajustaría a una segregación 3:1, es decir, 3 plantas resistentes a kanamicina : 1 planta sensible a kanamicina (figura 83). Para realizar el experimento, se reintrodujeron yemas axilares *in vitro*. Cuando estas yemas se desarrollaron, el ápice meristemático se cultivó en medio de enraizamiento suplementado con 100 mg/l de kanamicina. Se vio que 10 plantas eran resistentes a la kanamicina y 4 eran sensibles. El análisis de la χ^2 (prueba de Pearson) indicó que no había motivos para dudar de una segregación acorde con una distribución 3 kan^R : 1 kan^S ($\chi^2 = 0,10 < \chi^2_{1 \text{ g.l.}} (5\%) = 3,84$), correspondiente a la presencia de 2 insertos T-DNA con *nptII* funcional en la TG1. Con todo, se pudo ver que tampoco había motivos para dudar de una segregación 1 kan^R : 1 kan^S ($\chi^2 = 2,57 < 3,84$), correspondiente a la presencia de un solo T-DNA con *nptII* funcional en TG1. Esta segregación se podría explicar sobre la base de tres hipótesis: i) que los dos T-DNA se encuentren en tándem, ii) que el *nptII* de uno de los dos T-DNAs no sea funcional; y iii) que una de las dos copias se haya perdido. Si, de manera hipotética, los dos T-DNAs se encontraran en tándem o el *nptII* de uno de los dos T-DNAs no fuera funcional, sobre la base de los resultados de la caracterización de la progenie del cruce (todas las plantas WT), la conclusión sería que ninguno de estos T-DNAs sería responsable del fenotipo mutante. Si, por el contrario, uno de los dos T-DNAs se hubiera perdido, podría ocurrir que éste fuera responsable de la mutación y que no se transmitiera a la descendencia. Habida cuenta de que el fenotipo mutante parece no transmitirse a la descendencia, lo que podría ocurrir es que la mutación (y por ende, el T-DNA) afectara a la viabilidad de los gametos, de manera que sólo se desarrollarían aquellos embriones que no portan el alelo mutado. Mediante un análisis por Southern de cada una de estas plantas se podría determinar si uno de los T-DNA se ha perdido.

Como las 14 plantas del cruce aún se mantenían *in vitro*, decidimos aclimatarlas para analizar mediante Southern el número de copias de cada de ellas. Cuando las plantas comenzaron a desarrollar frutos observamos un resultado inesperado. En efecto, una de las 14 plantas que había producido frutos con semilla en la cosecha previa empezó a exhibir síntomas de senescencia similares a los del mutante. Es más, cuando se recolectaron los primeros frutos, se vio que éstos carecían de semilla (figura 84). Estos resultados sugieren una posible interacción entre la mutación y el ambiente previo en el que se cultivan las plantas (i.e. cultivo *in vitro*). En este sentido, conviene indicar que el mutante se mantiene *in vitro* y, para su caracterización a lo largo de las diferentes cosechas, tuvo que ser aclimatado y transferido a condiciones de cultivo *in vivo*.

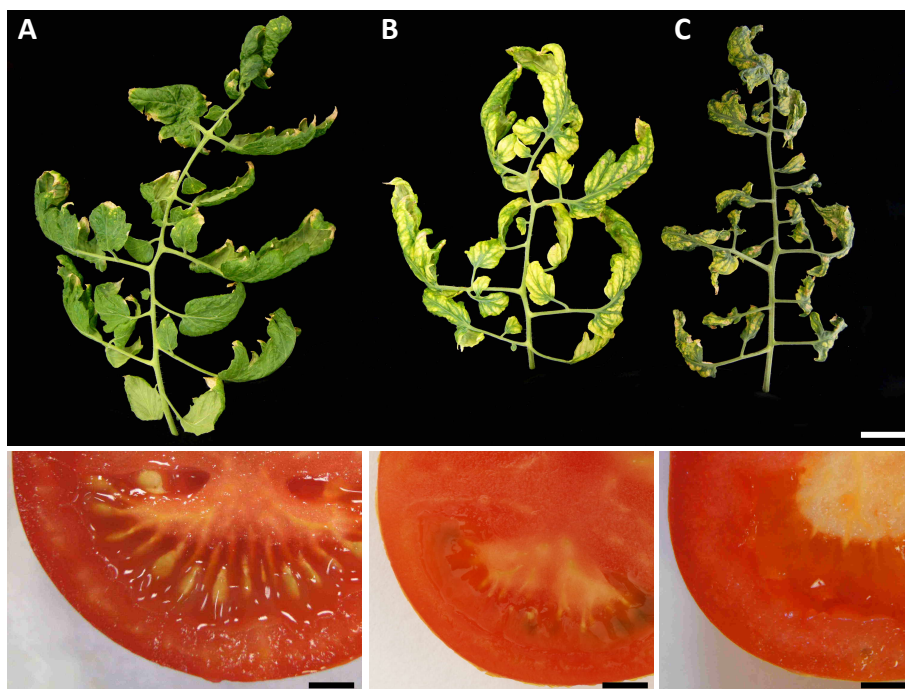


Figura 84. Hojas (arriba) y frutos (abajo) de MoneyMaker (A), de *Tom497* (B) y de una planta obtenida a partir del cruce entre el mutante y MoneyMaker (C). El fenotipo de la planta procedente del cruce se observó tras aclimatar la réplica reintroducida *in vitro*. Escala de las barras: A: 10cm; B: 5mm.

Por otro lado, y sobre la base de los resultados, no se puede descartar que el fenotipo esté promovido por la presencia de los dos T-DNAs. En este sentido, los resultados de la caracterización fenotípica (13 plantas WT : 1 planta mutante) indicarían que no hay motivos para dudar de una segregación 3 WT : 1 M ($\chi^2 = 2,38 < 3,84$). Nos encontraríamos, por tanto, en la hipotética situación que se propone en la figura 85.

Figura 85. Cruce entre un mutante dominante con 2 copias de T-DNA y una planta WT. Segregación genotípica, fenotípica (asumiendo que las dos copias de T-DNA promuevan el fenotipo dominante) y presencia o ausencia de T-DNA en la progenie resultante del cruce.

TG1 (M) A^maB^mb	(x)	WT aabb
↓		
Genotipo	Fenotipo	T-DNA (+ / -)
A^maB^mb 1/4	Mutante 1/4	+
Aabb 1/4	WT	+ 3/4
aaBb 1/4	WT 3/4	+
aabb 1/4	WT	- 1/4

A y **B** representan los 2 T-DNAs.

A + B promueven la mutación dominante (**A^m / B^m**) que da lugar al desarrollo de frutos sin semilla.

Por tanto, y teniendo en cuenta los resultados que se han obtenido, procederemos a cultivar un mayor número de plantas del cruce para volver a evaluar el fenotipo. Asimismo, de cada una de estas nuevas plantas se reintroducirán yemas axilares *in vitro*. Cuando estas yemas se desarrollen, las plantas se aclimatarán y se transferirán a invernadero para caracterizar el fenotipo. Sobre la base de los resultados se decidirá si se realizan análisis por Southern de genotipos concretos con el fin de comprobar si la hipótesis propuesta es, o no, correcta.

3.4.5. Corolario

Tom497 es un mutante dominante que desarrolla frutos partenocárpicos de menor calibre. La mutación tiene efectos pleiotrópicos ya que, además de las alteraciones en el desarrollo del fruto, el mutante tiene afectado el desarrollo vegetativo. En concreto, las plantas exhiben síntomas de senescencia a partir de una determinada etapa del desarrollo. Los análisis realizados parecen indicar que la ausencia de semillas en los frutos podría estar originada por alteraciones en el desarrollo de los sacos polínicos y del polen.

Sobre la base del análisis genético, no se puede descartar la posibilidad de que el fenotipo (incluyendo tanto la senescencia en las partes vegetativas de la planta como toda la gama de cambios en el desarrollo reproductivo) se deba a la mutación de dos genes.

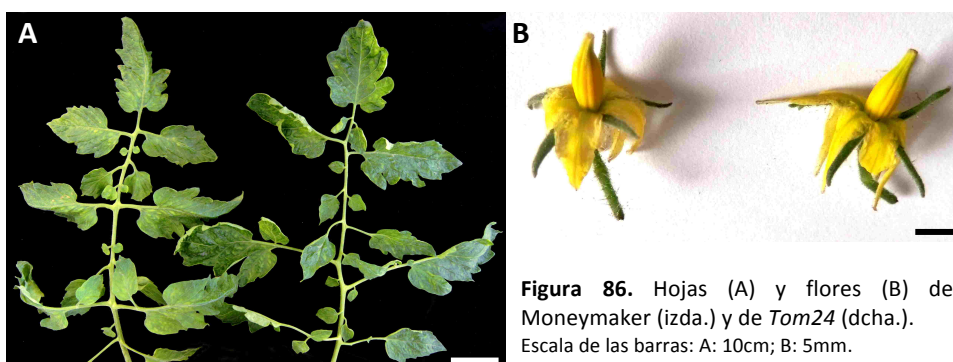
Por otro lado, la caracterización de la progenie procedente del cruce entre el mutante y el WT sugiere una interacción genotipo-ambiente. En efecto, al cultivar las plantas procedentes de semillas del retrocruce mutante x WT en el invernadero no se observó la aparición del fenotipo esperado en la mitad de la descendencia. Sin embargo, al reintroducir brotes axilares *in vitro* y mantenerlos por propagación clonal durante un tiempo considerable, algunas de las plantas aclimatadas sí exhiben el fenotipo mutante en el invernadero. Esto sugiere una interacción entre la mutación (o mutaciones) y un factor ambiental, probablemente relacionado con el estrés que se produce en cultivo *in vitro*.

Por último, los análisis Southern que se realizaron en Almería en el laboratorio del Dr. Lozano (UAL) indican que el mutante contiene dos insertos de T-DNA. Los experimentos de Anchor-PCR realizados en este mismo laboratorio indican que uno de los insertos está situado en una región del cromosoma 12, concretamente entre los unigenes SGN-U572884 (*Calmodulin-binding protein*) y SGN-U564273 (*Diacyl glycerol acyltransferasa*). En el momento actual en el laboratorio del Dr. Lozano se está intentando amplificar la región que flanquea al segundo inserto y, a partir de aquí, trataremos de identificar el gen o genes responsables del fenotipo mutante.

3.5. *Tom24*

3.5.1. Descripción de fenotipo mutante

Las plantas se evaluaron a lo largo de varias cosechas para verificar la reproducibilidad del fenotipo mutante. Asimismo, y con el objetivo de detectar una posible interacción entre el genotipo y el ambiente, el cultivo se llevó a cabo en diferentes invernaderos. El fenotipo del mutante se reprodujo siempre en todas las cosechas que se realizaron. En concreto, nunca se observaron alteraciones en la arquitectura de las plantas o el hábito de crecimiento. Tampoco se observaron diferencias en la morfología o el tamaño de las hojas del mutante (figura 86A). Por lo que respecta al desarrollo reproductivo, las inflorescencias y las flores siempre fueron similares a las de las plantas WT (figura 86B).



Sin embargo, los frutos de las plantas mutantes eran distintos a los del WT. En concreto, los frutos del mutante tenían un calibre sensiblemente menor y exhibían una morfología cordiforme (figuras 87A y 87C). En su interior, los lóculos estaban completamente rellenos de mucílago pero, a diferencia de los del WT, no tenían semillas sino rudimentos seminales (figuras 87B y 87D). Además, tenían un pericarpio más delgado que el de los frutos WT (figuras 87B y 87D).

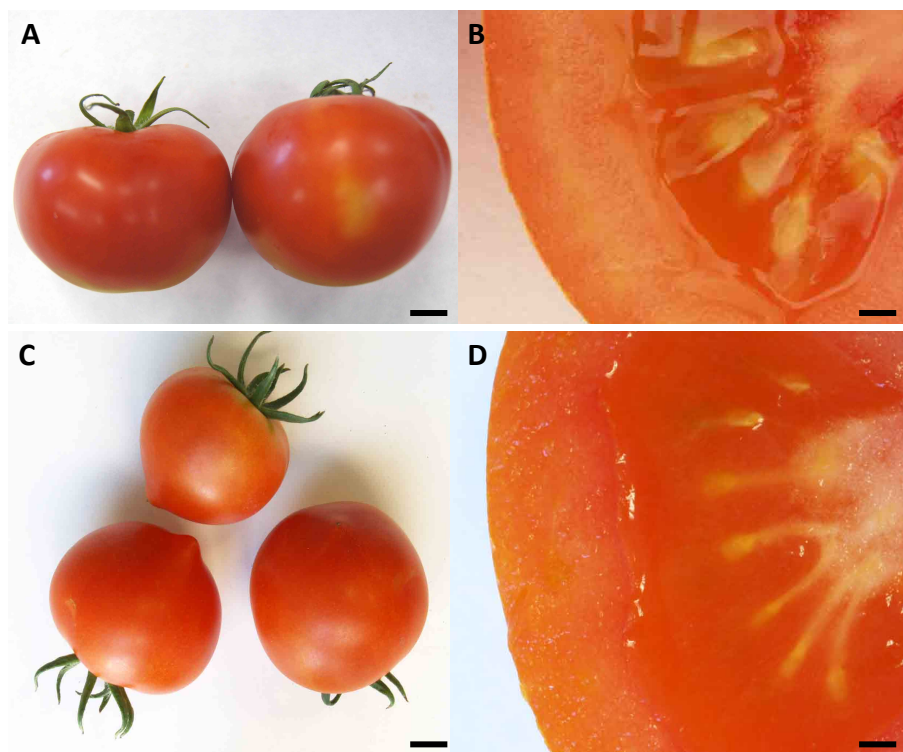


Figura 87. Frutos y detalle del interior del fruto de MoneyMaker (A y B) y de *Tom24* (C y D). Escala de las barras: A y C: 1cm; B y D: 2mm.

Con el fin de tener una idea más precisa de las diferencias en el desarrollo del fruto, analizamos algunas variables relacionadas con el calibre y la morfología del fruto en una muestra representativa del mutante y del WT. Acorde con lo que habíamos descrito en el párrafo anterior, los frutos del mutante pesaban en promedio unos 10 g menos que los del WT (tabla 18). Por lo que respecta a la forma del fruto, el índice de forma longitudinal (IFL) fue similar en los frutos del WT y del mutante, indicando su valor (en torno a $0,8 < 1$) que se trataba de frutos ligeramente achatados. El índice de forma transversal (IFT) fue también similar, y su valor cercano a la unidad indicó que las secciones transversales de fruto eran prácticamente circulares (tabla 18). Por lo que se refiere al interior del fruto, tanto los frutos del WT como del mutante tenían en torno a 2 lóculos y, como se comentaba en el párrafo anterior, el pericarpio de los frutos del mutante era más delgado que el de los frutos WT (tabla 18).

Tabla 18. Características de los frutos de Moneymaker y de *Tom24*.

Característica		MM		<i>Tom24</i>	
Calibre del fruto	Peso (g)	51,8 ±3,6 ^a	(21,2-107,5)	39,4 ±1,7 ^b	(20,4-61,2)
	Altura (cm)	3,9 ±0,1 ^a	(2,9-5)	3,6 ±0,1 ^a	(2,9-4,2)
	Diámetro 1 (cm)	4,8 ±0,1 ^a	(3,8-6,2)	4,4 ±0,1 ^b	(3,5-5,5)
	Diámetro 2 (cm)	4,5 ±0,1 ^a	(3,6-5,9)	4,1 ±0,1 ^b	(3,4-5,5)
Forma del fruto	IFL	0,81 ±0,01 ^a	(0,7-1)	0,82 ±0,01 ^a	(0,72-0,95)
	IFT	0,95 ±0,01 ^a	(0,87-1)	0,94 ±0,01 ^a	(0,80-1)
Interior del fruto	Nº de Lóculos	2,2 ±0,1 ^a	(2-3)	2,4 ±0,1 ^a	(2-3)
	Pericarpio (cm)	0,74 ±0,02 ^a	(0,5-1)	0,50 ±0,01 ^b	(0,3-0,6)
	IAP	0,16 ±0,00 ^a	(0,13-0,21)	0,12 ±0,00 ^b	(0,07-0,14)

Los valores se expresan como la media ± el error estándar. El rango se indica entre paréntesis. La caracterización se llevó a cabo con 31 frutos de Moneymaker y 44 frutos del mutante. Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student).

Diámetro 1= diámetro mayor, Diámetro 2= diámetro perpendicular al diámetro 1, IFL= Índice de forma longitudinal, IFT= Índice de forma transversal, Pericarpio= Anchura del pericarpio, IAP= Índice de anchura del pericarpio.

A lo largo de las diferentes cosechas, con independencia de la época o del invernadero en el que se cultivó el mutante, habíamos observado que el cuajado de fruto en las plantas mutantes era muy elevado en comparación con el que normalmente suele verse en el WT en nuestras condiciones de cultivo. Para tener una idea aproximada de la tasa de cuajado en el mutante, en una de las cosechas se contabilizó el número de frutos en 3-4 inflorescencias escogidas al azar. Hicimos exactamente lo mismo en plantas WT y se vio que en las plantas mutantes cuajaba casi el doble de frutos que en el WT (figura 88).



Figura 88. Inflorescencia de Moneymaker mostrando 5 frutos cuajados (izda.) e inflorescencia de *Tom24* mostrando 10 frutos cuajados (dcha.).

Para evaluar de manera más precisa la tasa de cuajado en el mutante, en una de las cosechas se contabilizó el número de flores y frutos cuajados en las 7 primeras inflorescencias de plantas mutantes y WT. Como se puede ver en la tabla 19, las plantas mutantes desarrollaron de media 3 flores más por inflorescencia que el WT aunque las diferencias no resultaron significativas desde un punto de vista estadístico. Sí que resultó significativo el número de frutos por inflorescencia, ya que en el mutante cuajaron más del doble de frutos que en el WT. Al calcular la tasa de cuajado, pudimos comprobar que, en consonancia con lo que se había visto a lo largo de todas cosechas previas, la tasa de cuajado del mutante era significativamente mayor, en concreto, del 80% mientras que, en las mismas condiciones, el WT tenía una tasa de cuajado cercana al 40%.

Tabla 19. Número de flores y de frutos por inflorescencia y tasa de cuajado de Moneymaker y del mutante *Tom24*.

Genotipo	Nº de Flores / Inflorescencia	Nº de Frutos / Inflorescencia	Tasa de Cuajado (%)
Moneymaker	10,8 ± 0,7 ^a	4,1 ± 0,3 ^a	38 ± 2 ^a
<i>Tom24</i>	14,1 ± 1,3 ^a	10,5 ± 0,4 ^b	76 ± 5 ^b

Las medias se expresan como el promedio ± el error estándar.

Se evaluaron las 7 primeras inflorescencias en 10 plantas de Moneymaker y 3 mutantes.

Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student).

En definitiva, se trata de un mutante que despierta un enorme interés, ya que si bien no manifiesta alteraciones en su desarrollo vegetativo, produce frutos sin semilla de un calibre interesante y exhibe una elevada tasa de cuajado.

3.5.2. Análisis de las alteraciones en el desarrollo reproductivo

Habida cuenta de que los frutos de las plantas mutantes no producían semilla, y con el fin de observar el fenotipo mutante en la descendencia, a lo largo de las diferentes cosechas se realizaron cruces con plantas WT (Moneymaker) en ambas direcciones. Tras realizar innumerables cruces, nos dimos cuenta de que sólo era posible obtener descendencia cuando se utilizaba el mutante como receptor de polen y en ningún caso se obtenían frutos con semillas cuando se utilizaba el mutante como donador de polen. También habíamos apreciado que de las flores del mutante se extraía muy poco polen (figura 89).

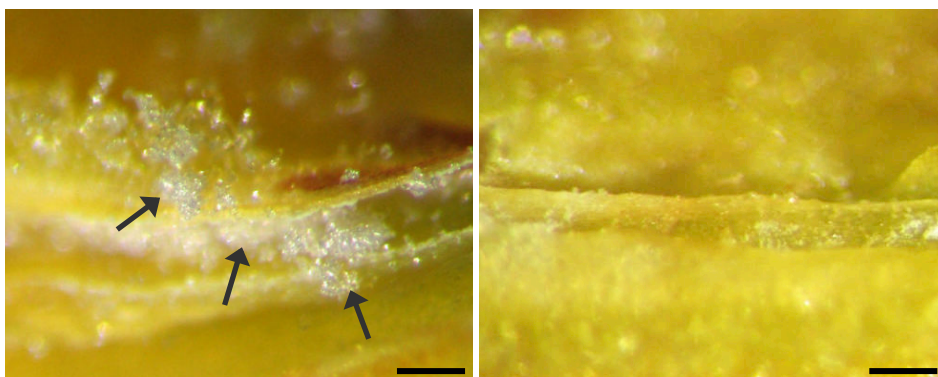


Figura 89. Detalle de la zona de dehiscencia en una antera de una flor en antesis de Moneymaker (izda.) y de *Tom24* (dcha.). Las flechas indican granos de polen. Escala de las barras: 200µm.

Decidimos, por tanto, analizar la viabilidad del polen mediante una tinción con acetato de carmín para verificar si una de las razones de que los frutos del mutante no tuvieran semillas se debía a la ausencia de viabilidad del polen. Se vio que la tasa de viabilidad del polen extraído de las flores WT rondaba el 98% ($\pm 1\%$), y sólo esporádicamente se observaba algún grano de polen inviable (figuras 90A y 90C). Sin embargo, tal y como preveíamos, la tasa de viabilidad de polen del mutante era prácticamente nula. A diferencia de lo que ocurría con el WT, la cantidad de granos de polen que éramos capaces de extraer de cada flor mutante era muy escasa. En concreto, no fuimos capaces de observar más de 50 granos de polen por flor. Además,

la mayor parte de los granos de polen que podíamos extraer tenía una morfología anómala, tal y como se puede ver en las figuras 90B y 90D. Con todo, como se muestra en la figura 90E, en alguna de las preparaciones pudimos observar unos pocos granos de polen de morfología esférica y teñidos con mayor o menor intensidad. En definitiva, los resultados obtenidos en las preparaciones de acetato de carmín indicaban que el polen de las flores mutantes no era viable, lo que explicaba que no se pudiera obtener descendencia cuando se utilizaba el mutante como donador de polen.

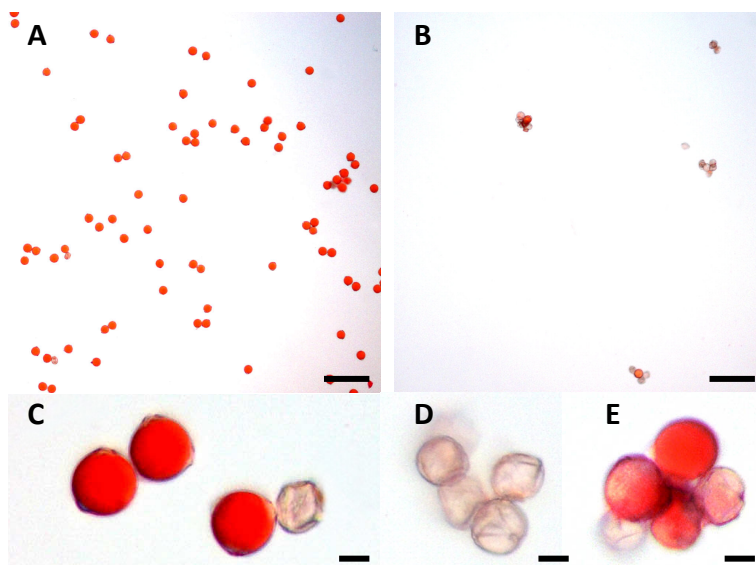


Figura 90. Tinción vital con acetato de carmín del polen de Moneymaker (A y C) y de *Tom24* (B, D y E).

Escala de las barras: A y B: 100 μ m, C y D: 10 μ m.

Con el objetivo de determinar en qué momento de la androgénesis se producía la degeneración de los granos del polen en el mutante, realizamos cortes histológicos en diferentes estadios del desarrollo floral. Pudimos ver que las anteras de las flores del mutante y del WT tenían aproximadamente el mismo tamaño. Sin embargo, los sacos polínicos de las flores del mutante eran considerablemente más pequeños (figura 91).

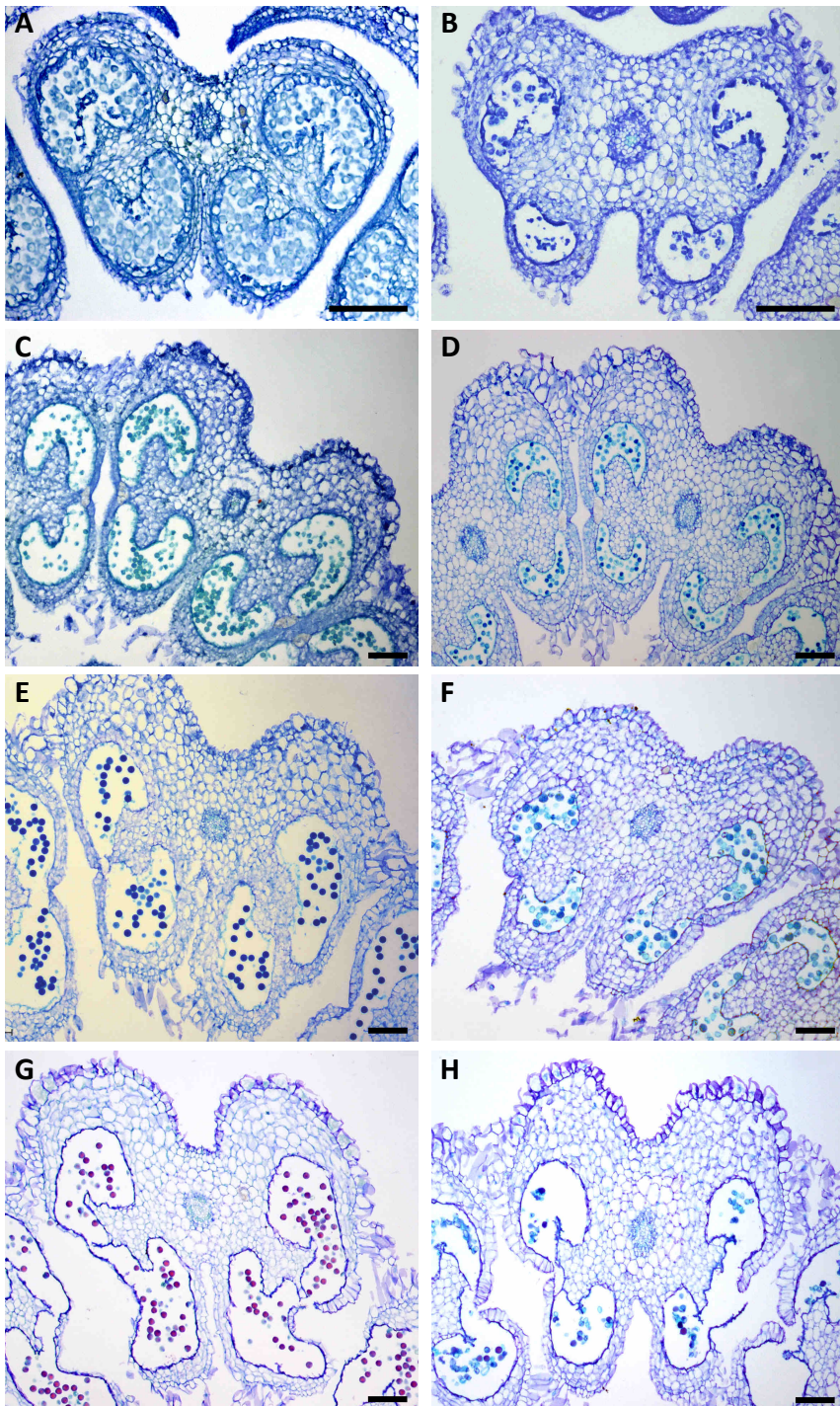


Figura 91. Histología de las anteras de Moneymaker (izda.) y de *Tom24* (dcha.) en los estadios de botón floral 1 (A y B), botón floral 2 (C y D), preantesis (E y F) y antesis (G y H). Escala de las barras: 100µm.

Este menor tamaño ya se observa desde los primeros estadios de desarrollo que analizamos (i.e. botón floral 1), lo que indica que las alteraciones en el tejido esporógeno ocurren en estadios más tempranos del desarrollo floral. Las observaciones que hacíamos al microscopio indicaban que los sacos polínicos del mutante contenían menores cantidades de polen (figuras 91B, 91D, 91F y 91H vs figuras 91A, 91C, 91E y 91G). Con todo, como se puede ver en la figura 91H, pudimos observar una correcta apertura de los sacos polínicos en el estadio de antesis. Por tanto, la escasa cantidad de polen que éramos capaces de obtener parece que se debe al menor tamaño de los sacos polínicos junto con el hecho de que estos contienen menos polen. Los resultados del análisis histológico de las anteras sugieren que las alteraciones de los sacos polínicos ocurren en estadios muy tempranos del desarrollo floral.

Por lo que se refiere al desarrollo del polen y sobre la base de las evidencias fotográficas, la morfología y pigmentación de los granos inmaduros de polen del mutante en los estadios de botón floral 1 y 2 era parecida a la que exhibían los de las plantas WT (figuras 92A vs 92B y 92C vs 92D). En estos estadios de desarrollo los granos de polen se encuentran en las etapas de microsporas envueltas en calosa (botón floral 1) y microsporas libres con morfología irregular (botón floral 2).

Es a partir del estadio de preantesis cuando empezamos a observar diferencias importantes entre el mutante y el WT. En este estadio de desarrollo, la mayor parte de los granos de polen del WT tenían una morfología esférica y exhibían una fuerte tinción azul mientras que los del mutante seguían exhibiendo una morfología irregular y una pigmentación azul pálido, lo que parece indicar que no habían sido capaces de superar el estadio de microspora libre, es decir, no se habían diferenciado los núcleos vegetativo y generativo, y no se había producido la acumulación de cuerpos lipídicos (figuras 91E y 91F). Con todo, en alguno de los campos de visión del microscopio se encontró algún grano de polen similar en morfología y tinción a los que se vieron en la preparación del WT (figura 91F).

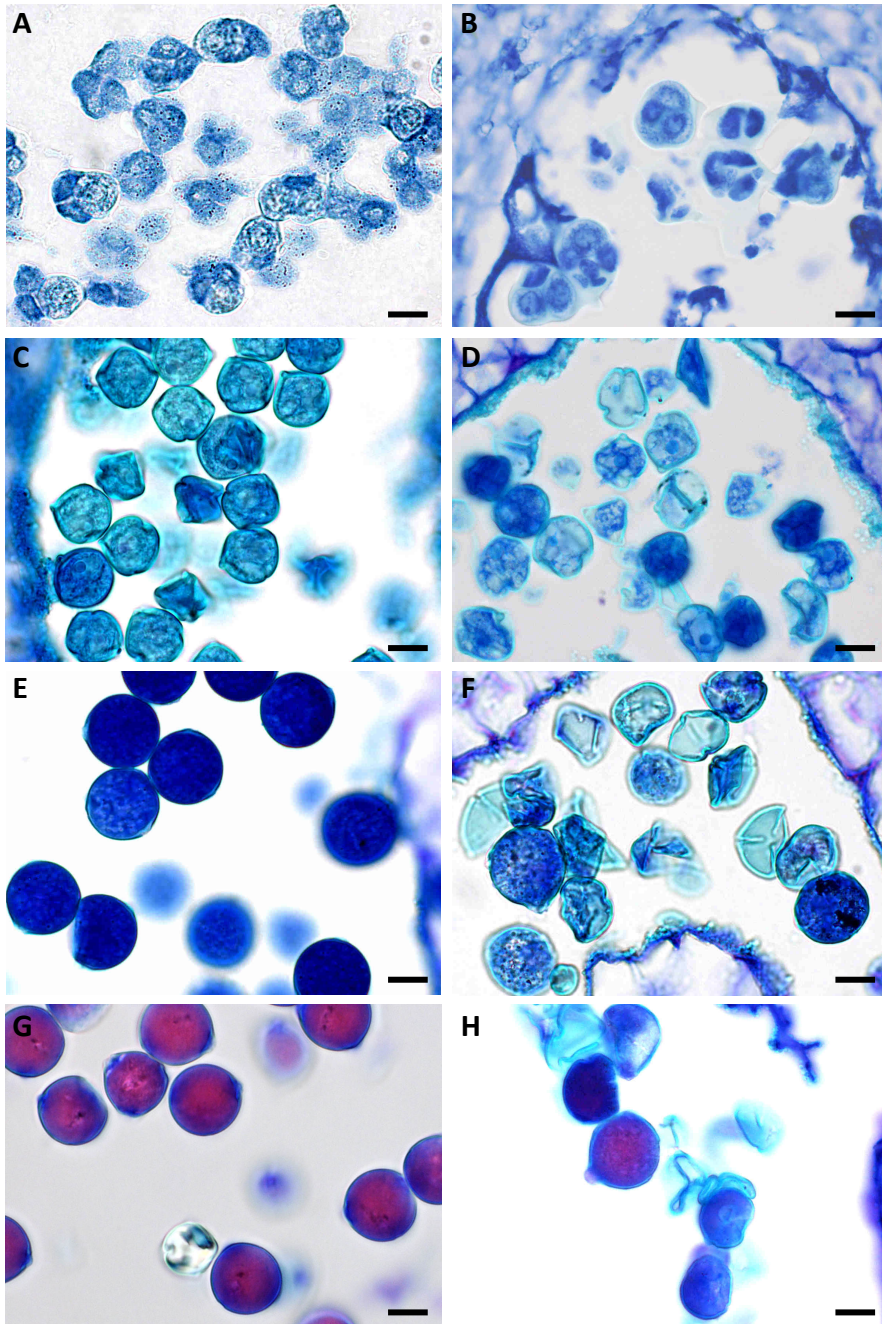


Figura 92. Granos de polen de flores de MoneyMaker (izda.) y de *Tom24* (dcha.) en los estadios de botón floral 1 (A y B), botón floral 2 (C y D), preantesis (E y F) y antesis (G y H). Escala de las barras: 10 μ m.

En estadio de antesis se observaron más claramente las diferencias entre los granos de polen del WT y del mutante. En este estadio de desarrollo floral, la mayor parte de los granos de polen del WT seguían siendo completamente esféricos y exhibían una pigmentación purpura (figura 91G). En el mutante, los granos de polen seguían siendo en su mayoría irregulares y de color azul pálido (figura 91H). De nuevo, y al igual que ocurría en el estadio de preantesis, se encontró algún grano de polen similar en morfología y tinción a los que se vieron en la preparación del WT (figura 91H). Tal y como se observó en el ensayo de tinción con acetocarmín, en estadio de antesis la mayoría de los granos de polen del mutante es inviable, salvo algunos pocos que parecen exhibir un desarrollo normal. Los resultados del análisis histológico parecen indicar que los cambios más dramáticos que conducen a la inviabilidad del polen acontecen a partir del estadio de botón floral 2.

Se realizó también un análisis histológico del ovario para ver si se producían alteraciones que permitieran clarificar el por qué los frutos se desarrollaban sin semilla. No se observaron en este sentido diferencias entre el WT y el mutante en los diferentes estadios de desarrollo que se analizaron. Tal y como se puede ver en la figura 93, que muestra un corte del ovario en el estadio de antesis, los óvulos del mutante son similares a los del WT. Por otro lado, quisimos comprobar si se producía un desarrollo prematuro del ovario, y para ello se midió el calibre de una muestra representativa de ovarios del WT y del mutante en el estadio de antesis. Pudimos comprobar que en este estadio del desarrollo floral el diámetro de los ovarios del WT y del mutante era similar (tabla 20), lo cual indica que no se produce un desarrollo prematuro del ovario en este mutante.

Tabla 20. Características del ovario de Moneymaker y de *Tom24* el estadio de antesis.

Genotipo	Diámetro del Ovario (mm)	Nº de Carpelos
Moneymaker	1,89 ± 0,04 ^a	2,1 ± 0,1 (2-3) ^a
<i>Tom24</i>	2,02 ± 0,07 ^a	2,2 ± 0,1 (2-3) ^a

Los valores se expresan como la media ± el error estándar y el rango entre paréntesis. Para cada genotipo, la caracterización se llevó a cabo con 10 flores. Distintas letras indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$; test de Student).

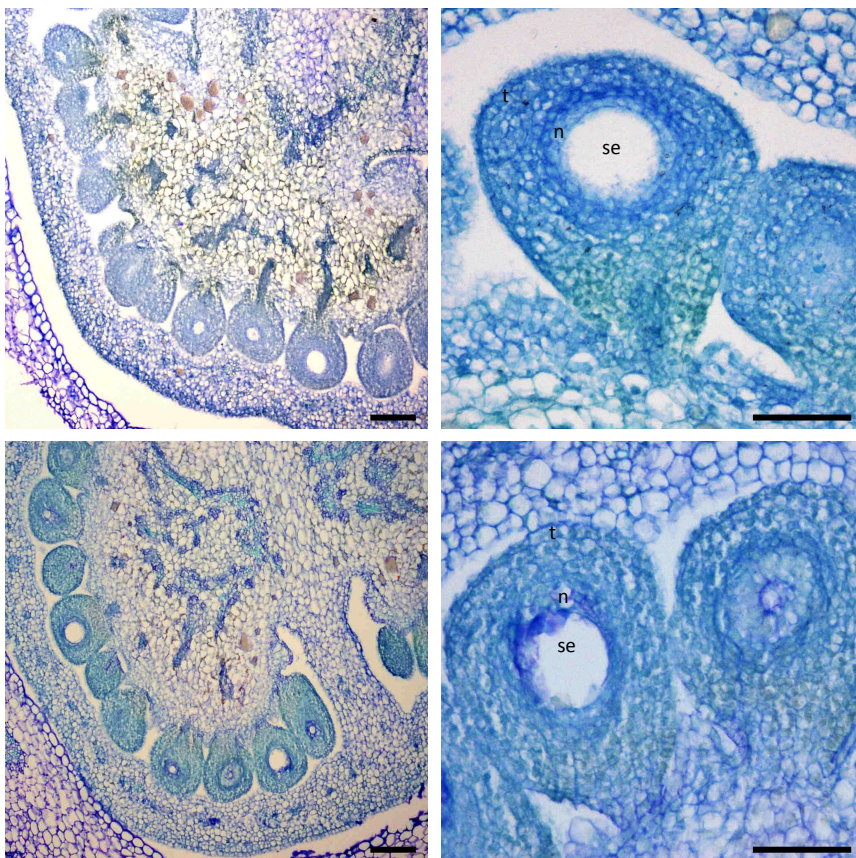


Figura 93. Secciones transversales de ovarios en antesis y detalle de los óvulos de Moneymaker (arriba) y de *Tom24* (abajo).
n= nucela; se= saco embrionario; t= tegumentos del óvulo.
Escala de las barras: 1mm.

Por tanto, acorde con lo que parecen indicar los resultados del cruce entre el WT y el mutante como receptor del polen, las alteraciones que conducen al desarrollo de frutos sin semillas en este mutante no parecen estar relacionadas con el desarrollo del ovario y de los óvulos.

3.5.3. Análisis de la expresión del gen delator *UidA*

Habida cuenta de las características de la trampa de intensificadores empleada para generar la población de líneas de T-DNA, se analizó la expresión del delator *UidA* para ver si nos daba algunas pistas sobre el patrón de expresión del gen alterado en el mutante. En estructuras vegetativas, el delator sólo se expresó de forma muy localizada y de manera tenue en ápices y hojas jóvenes (figura 94). Sin embargo, no detectó expresión en hojas desarrolladas ni en otras estructuras vegetativas.



Figura 94. Expresión del gen delator (*UidA*) en ápices de *Tom24*.
tj= tallo joven; hj= hoja joven
Escala de la barra: 1mm.

Por lo que respecta a órganos o tejidos reproductivos, se detectó expresión del delator en los pétalos de la flor en todos los estadios de desarrollo analizados y en los estambres a partir del estadio de botón floral 2 (figura 95). Aunque la expresión en estambres fue tenue, la tinción parece localizarse en los tejidos estructurales de las anteras (figuras 95F y 95G). También se detectó tinción del delator en granos de polen en el estadio de postantesis (figura 95H). Por tanto, no se puede descartar la posibilidad de que la expresión del delator pueda estar relacionada con las alteraciones que se han observado en los análisis histológicos.

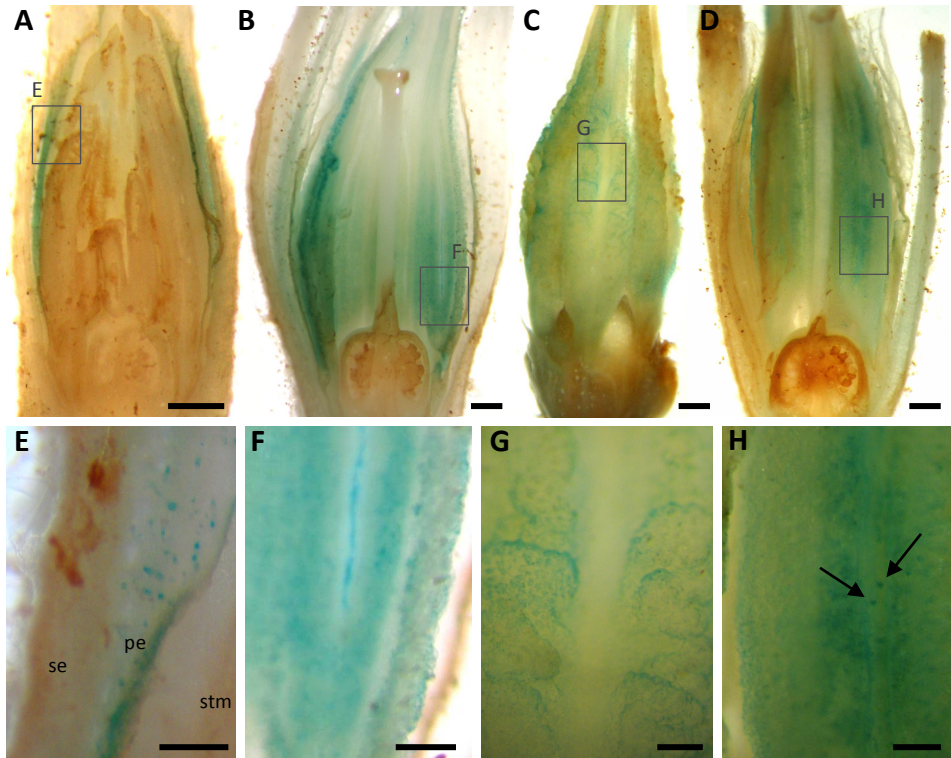


Figura 95. Expresión del gen delator (*Uida*) en flores de *Tom24* en estadios de botón floral 1 (A y E), botón floral 2 (B y F), antesis (C y G) y 2 días postantesis (D y H).

Se= sépalo; pe= pétalo; stm= estambre. Las flechas en H indican presuntos granos de polen.

Escala de las barras: A, B, C y D: 500 μ m; E, F, G y H: 200 μ m.

En fruto, se detectó expresión del delator en el pedicelo y en la zona de inserción de los pedicelos de frutos recién cuajados de 0,8-1cm de diámetro (figuras 96B y 96C). En frutos de 2cm de diámetro se observó expresión en los mismos tejidos aunque la tinción fue más tenue (figuras 96E y 96F). En frutos de 2,5 cm de diámetro tan sólo se observa una leve tinción azul en la zona de abscisión del pedicelo (figuras 96H y 96J). Sin embargo, conviene indicar que en este estadio de desarrollo ya se empiezan a visualizar falsos positivos (tinción azul tenue) en las semillas de los frutos de Moneymaker (figura 96G). A partir del estadio verde maduro, se detectó expresión del delator en todos los tejidos de los frutos del mutante, aunque también se detectaron falsos positivos en diferentes tejidos de los frutos WT (figuras 96K-96N). Por tanto, a pesar de que los frutos del mutante exhiben una tinción azul más intensa que podría

estar relacionada con el desarrollo del fruto en ausencia de polinización, el hecho de que los frutos del WT también exhiban una tonalidad azul en la prueba histoquímica no permite establecer un patrón de expresión del delator asociado a la mutación.

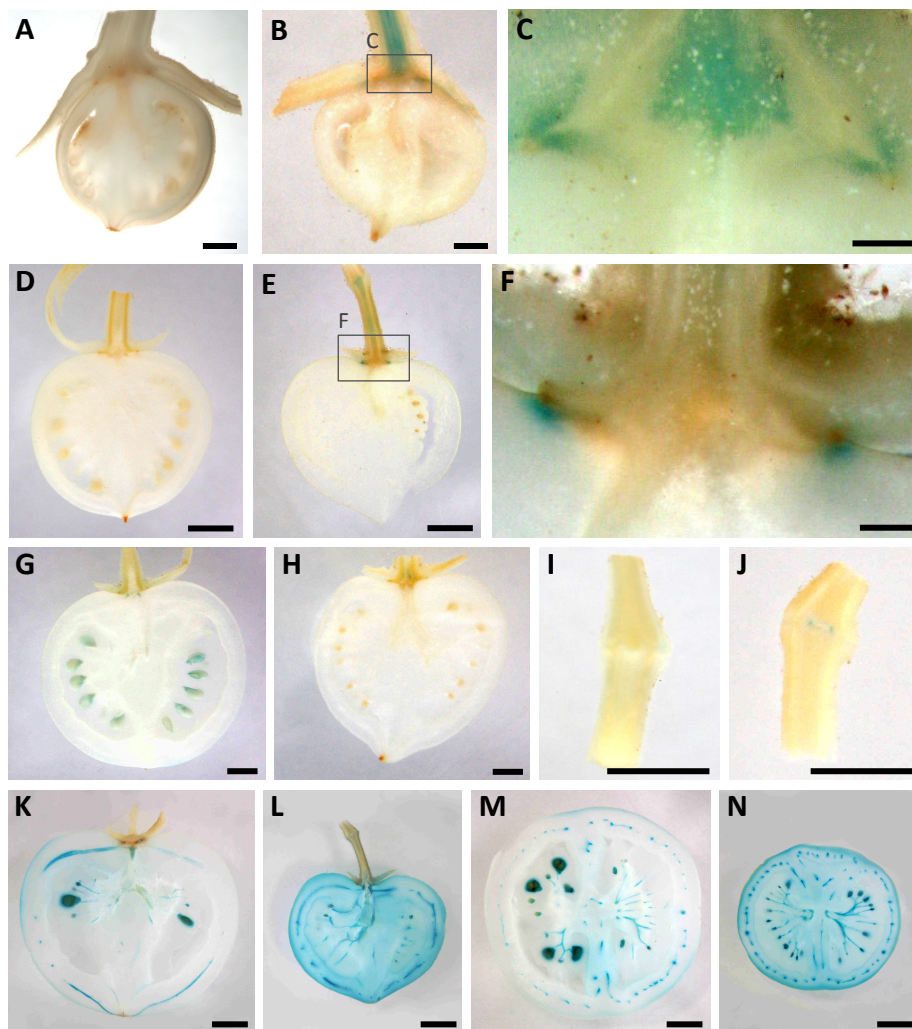


Figura 96. Expresión del gen delator (*Uida*) en frutos de *Tom24*. A-B) Expresión GUS en frutos de 0,8cm de Moneymaker (A) y del mutante (B). C) Detalle de la expresión GUS en el fruto de 0,8cm del mutante. D-E) Expresión GUS en frutos de 2cm de Moneymaker (D) y del mutante (E). F) Detalle de la expresión GUS en el fruto de 2cm del mutante. G-H) Expresión GUS en frutos de 2,5cm de Moneymaker (G) y del mutante (H). I-J) Expresión GUS en los pedúnculos de frutos de 2,5cm de Moneymaker (I) y del mutante (J). K-N) Expresión GUS en frutos en estadio Verde Maduro de Moneymaker (K y M) y del mutante (L y N).

Escala de las barras: A y B: 2mm; C y F: 500µm; D, E y G-J: 5mm; K-N: 1cm.

3.5.4. Análisis genético de la descendencia procedente del cruce entre el mutante y el WT

Como se ha comentado en un apartado anterior, se obtuvieron semillas procedentes del cruce utilizando el mutante como receptor de polen. A pesar de haberlo intentado en las diferentes cosechas, el cruce en la otra dirección nunca dio descendencia.

Teniendo en cuenta la naturaleza dominante de la mutación, nosotros esperábamos observar en la descendencia del cruce una segregación 1 : 1 (1 planta mutante : 1 planta WT), asumiendo que la mutación (de tipo insercional o somaclonal) es el resultado de la alteración de un simple gen. Por otro lado, sobre la base de los análisis Southern que se realizaron en Almería en el laboratorio del Dr. Rafael Lozano (UAL), sabemos que el mutante contiene tres insertos de T-DNA. Así, partiendo de esta información, esperábamos detectar una segregación para el T-DNA acorde con una distribución 7 : 1 (7 plantas con T-DNA : 1 planta sin T-DNA). En la figura 97 se propone el modelo teórico asumiendo que uno de los 3 T-DNA integrados es el responsable de la mutación.

Figura 97. Cruce entre un mutante dominante con 3 copias de T-DNA y una planta WT. Segregación genotípica, fenotípica (asumiendo que una de las copias de T-DNA promueve una mutación dominante) y presencia o ausencia de T-DNA en la progenie resultante del cruce.

TG1 (M)		WT
$A^m aBbCc$	(x)	aabbcc
	↓	
Genotipo	Fenotipo	T-DNA (+ / -)
$A^m aBbCc$ 1/8	Mutante	+
$A^m aBbcc$ 1/8	Mutante	+
$A^m abbCc$ 1/8	Mutante 4/8	+
$A^m abbcc$ 1/8	Mutante	+ 7/8
aaBbCc 1/8	WT	+
aaBbcc 1/8	WT	+
aabbCc 1/8	WT	+
aabbcc 1/8	WT	- 1/8

A, B y C representan los 3 T-DNAs.

A promueve la mutación dominante (A^m) que da lugar al desarrollo de frutos sin semilla.

Con el objetivo de llevar a cabo el análisis genético de la mutación, se cultivaron 23 plantas procedentes del cruce entre el mutante y Moneymaker. Cuando las plantas crecieron y comenzaron a desarrollar frutos, se evaluó el tipo de fruto en cada una de las plantas. Observamos que los frutos de las 23 plantas tenían semilla. Es decir, ninguna de las plantas exhibía el fenotipo mutante.

Para detectar la presencia o ausencia del T-DNA decidimos evaluar la resistencia/sensibilidad a la kanamicina de cada una de las plantas. En principio, asumíamos que las tres copias de T-DNA contendrían un *nptII* funcional y que no se encontrarían en tándem. De ser así, la segregación se ajustaría a una distribución $7 \text{ kan}^R : 1 \text{ kan}^S$. De no ser así, los datos se podrían ajustar a una segregación $3 \text{ kan}^R : 1 \text{ kan}^S$ (en el caso de que una de las tres copias no tuviera *nptII* funcional o se hubiera perdido) o a una segregación $1 \text{ kan}^R : 1 \text{ kan}^S$ (en el caso de que dos de las tres copias no tuvieran *nptII* funcional o se hubieran perdido).

Para evaluar la resistencia o sensibilidad a la kanamicina se reintrodujeron yemas axilares *in vitro*. Cuando estas yemas se desarrollaron, el ápice meristemático se cultivó en medio de enraizamiento suplementado con 100 mg/L de kanamicina. Se vio que 21 plantas eran resistentes a la kanamicina y 2 eran sensibles. El análisis de la χ^2 (prueba de Pearson) indicó que no había motivos para dudar de una segregación acorde con una distribución $7 \text{ kan}^R : 1 \text{ kan}^S$ ($\chi^2 = 0,59 < \chi^2_{1 \text{ g.l.}}(5\%) = 3,84$). Con todo, tampoco había motivos para dudar de una segregación $3 \text{ kan}^R : 1 \text{ kan}^S$ ($\chi^2 = 3,26 < 3,84$), ni tampoco de una segregación $15 \text{ kan}^R : 1 \text{ kan}^S$ ($\chi^2 = 0,23 < 3,84$).

Los resultados del fenotipado de las plantas (todas eran WT) indicaron que la mutación no se transmitía a la progenie. Una de las posibles explicaciones de este resultado es que la mutación afecte a la viabilidad de los gametos (en este caso, al menos, el gameto femenino), de manera que sólo se desarrollan aquellos embriones que no portan el alelo mutado. Si la mutación tiene un origen somaclonal, la progenie de la descendencia del cruce segregaría para las tres copias de T-DNA (figura 98).

Figura 98. Cruce entre un mutante dominante con 3 copias de T-DNA y una planta WT. Segregación genotípica, fenotípica (asumiendo que la mutación es de origen somaclonal) y presencia o ausencia de T-DNA en la progenie resultante del cruce.

TG1 (M)				WT	
AaBbCc^md		(x)		aabbccdd	
		↓			
Genotipo		Fenotipo		T-DNA (+ / -)	
AaBbCc^md	1/16	Mutante		+	
AaBbcc^md	1/16	Mutante		+	
AabbCc^md	1/16	Mutante		+	
Aabbcc^md	1/16	Mutante	7/16	+	
aaBbCc^md	1/16	Mutante		+	
aaBbcc^md	1/16	Mutante		+	
aabbCc^md	1/16	Mutante		+	14/16
AaBbCcdd	1/16	WT		+	
AaBbccdd	1/16	WT		+	
AabbCcdd	1/16	WT		+	
Aabbccdd	1/16	WT	7/16	+	
aaBbCcdd	1/16	WT		+	
aaBbccdd	1/16	WT		+	
aabbCcdd	1/16	WT		+	
aabbcc^md	1/16	Mutante	1/16	-	
aabbccdd	1/16	WT	1/16	-	2/16

A, B y C representan los 3 T-DNAs

d^m representa una mutación somaclonal dominante que da lugar al desarrollo de frutos sin semilla

Los resultados del análisis de segregación para la resistencia a la kanamicina no descartan esta hipótesis ya que, como comentábamos anteriormente, no hay motivos para dudar de una segregación acorde con una distribución $7 \text{ kan}^R : 1 \text{ kan}^S$ ($\chi^2 = 0,59 < 3,84$). Sin embargo, teniendo en cuenta que tampoco había motivos para dudar de una segregación $3 \text{ kan}^R : 1 \text{ kan}^S$ ($\chi^2 = 3,26 < 3,84$), la otra posibilidad es que uno de los tres T-DNA sea el responsable de la mutación. Si fuera así, este T-DNA no se transmitiría a la descendencia y ésta sólo segregaría para los otros dos T-DNA (figura 99).

Figura 99. Cruce entre un mutante dominante con 3 copias de T-DNA y una planta WT. Segregación genotípica, fenotípica (asumiendo que una de las copias de T-DNA promueva una mutación dominante) y presencia o ausencia de T-DNA en la progenie resultante del cruce.

TG1 (M) $A^m a B b C c$	(x)	WT $a a b b c c$
↓		
Genotipo	Fenotipo	T-DNA (+ / -)
$A^m a B b C c$	Mutante	+
$A^m a B b c c$	Mutante	+
$A^m a b b C c$	Mutante	+
$A^m a b b c c$	Mutante	+
$a a B b C c$ 1/4	WT	+
$a a B b c c$ 1/4	WT	+
$a a b b C c$ 1/4	WT	+
$a a b b c c$ 1/4	WT	-
	100 %	3/4
		1/4

A, B y C representan los 3 T-DNAs

A promueve la mutación dominante (A^m) que da lugar al desarrollo de frutos sin semilla pero no se transmite a la descendencia

Para detectar la presencia o ausencia del posible T-DNA responsable de la mutación, en el laboratorio del Dr. Lozano (Universidad de Almería) se realizaron Southern de las 23 plantas procedentes del cruce. Los resultados indicaron que las dos plantas sensibles a la kanamicina no contenían T-DNA y que las 21 plantas restantes sólo contenían 2 de los tres insertos de T-DNA presentes en el mutante.

Teniendo en cuenta que la probabilidad asociada a un genotipo del retrocruce que contenga los 3 insertos ($A^m a B b C c$) es 1/8, para detectar este genotipo concreto con una probabilidad de fallo del 5% (o lo que es lo mismo con un nivel de confianza del 95%) se deberían de cultivar más de 22 plantas del cruce¹. Nosotros cultivamos 23, es decir, nos encontrábamos muy próximos al tamaño mínimo de familia que debería permitir detectar ese genotipo.

¹Una probabilidad de fallo inferior al 5% ($P_f < 5\%$) implica una tamaño de familia $N > \lg(P_f) / \lg(1-p)$. En este caso, la probabilidad del evento deseado es $p = 1/8$.

Como no se ha detectado el genotipo en cuestión en una muestra suficiente, nuestra hipótesis es que el fenotipo mutante se debe a un inserto de T-DNA que, por la razón que sea, provoca letalidad en ambos tipos de gametos (i.e. ♂ y ♀) y que por tanto no se transmite a la descendencia. Si nuestra hipótesis es correcta, este es el inserto responsable del fenotipo y por tanto hay que centrar los esfuerzos en dicho inserto. Esto es precisamente lo que están haciendo en el laboratorio del Dr. Lozano. De momento, han sido capaces de identificar un fragmento de restricción (número 2) que aparece en la TG1 (es decir, en el mutante original) pero que desaparece, o no está presente, en las plantas del retrocruce. A partir de aquí, están tratando de amplificar por Anchor-PCR las secuencias que flanquean a dicho inserto a fin de llegar a identificar el gen etiquetado en el mutante.

Actualmente, están estudiando la manera de identificar las secuencias adyacentes a la copia que no se transmite a la descendencia. Los resultados obtenidos hasta la fecha no descartan la posibilidad de que una de las copias de T-DNA sea la responsable del fenotipo mutante.

3.5.5. Corolario

Los frutos del mutante *Tom24* tienen forma cordiforme, un calibre inferior al de los frutos wild-type y carecen de semillas, existiendo en su lugar rudimentos seminales. Además de estas alteraciones, la TG1 mostró una tasa de cuajado de fruto superior a la de Moneymaker.

También vimos que el polen de las flores de este mutante mostró un desarrollo anómalo, no llegando a formarse casi polen funcional, lo que explicó la ausencia de semillas en los frutos. Sin embargo, los óvulos del mutante parecían normales.

Se analizó de manera exhaustiva el patrón de expresión del gen *Uida* en la TG1 de *Tom24*. Sobre la base de los resultados, emitimos la hipótesis de que la expresión del delator en anteras podría estar relacionada con la alteración del polen.

La evaluación de las plantas de retrocruce del mutante con el wild-type no permitió establecer una relación entre el fenotipo mutante y un inserto de T-DNA. Sin

embargo, los análisis Southern revelan que la TG1 (i.e. el mutante original) tiene tres insertos de T-DNA, mientras que en las plantas de retrocruce solo se detectan dos. Estos resultados sugieren que la mutación podría deberse a un inserto de T-DNA que no se transmite a la descendencia. Actualmente, se está intentando identificar las secuencias adyacentes a la copia que no se transmite a la descendencia.

1. UTILIDAD DE LOS MUTANTES PARA LA DISECCIÓN GENÉTICA DE CARACTERES COMPLEJOS

Cuando se aborda la disección genética de un carácter complejo, lo que realmente importa es identificar los genes con efectos principales, ya que su alteración puede provocar cambios cualitativos en el fenotipo. Para este propósito, el uso de una aproximación basada en la identificación de mutantes tiene dos ventajas: la identificación de un mutante revela que el gen alterado tiene un efecto clave sobre el carácter y, en segundo lugar, el fenotipo del mutante permite hacer una inferencia sobre la función del gen.

Respecto al uso de los mutantes espontáneos, la mutagénesis insercional proporciona, en principio, el camino más rápido para la clonación del gen mutado (Radhamony *et al.*, 2005), ya que basta con amplificar a partir de una secuencia conocida mediante técnicas basadas en PCR. Por otro lado, y en comparación con el sistema de mutagénesis insercional con transposones, el empleo del T-DNA como mutágeno tiene como enorme ventaja que sus inserciones son química y físicamente estables a lo largo de las generaciones (Radhamony *et al.*, 2005). Además, el T-DNA no tiene puntos preferentes de integración a lo largo del genoma, a diferencia de lo que ocurre con ciertos transposones (Miyao *et al.*, 2003; Kolesnik *et al.*, 2004; Sallaud *et al.*, 2004). La mutagénesis insercional con T-DNA se está utilizando con éxito en *Arabidopsis* (Feldmann, 1991; Krysan *et al.*, 1999; Curtis *et al.*, 2009) y arroz (Jeon *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2002; Sallaud *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2015a) donde se han

DISCUSIÓN

obtenido centenares de miles de líneas etiquetadas de enorme valor para la investigación básica y aplicada. De forma similar, aunque a menor escala, se han obtenido líneas T-DNA en otras especies como *Lotus japonicus* (Webb *et al.*, 2000), *Medicago truncatula* (Scholte *et al.*, 2002), *Salvia miltiorrhiza* (Lee *et al.*, 2008), *Brachypodium distachyon* (Vain *et al.*, 2008), *Brassica rapa* (Lee *et al.*, 2004), álamo (Harrison *et al.*, 2007), tomate (Mathews *et al.*, 2003), cebada (Zhao *et al.*, 2006), fresa (Oosumi *et al.*, 2006) y *Solanum pennellii* (Atarés *et al.*, 2011).

En nuestro laboratorio se está abordando un Programa de Mutagénesis Insercional en tomate y especies silvestres relacionadas en colaboración con los grupos del Dr. Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia). El principal objetivo de este proyecto es identificar genes que controlan caracteres del desarrollo de relevancia agronómica así como determinantes de la tolerancia a la salinidad. Evidentemente, no pretendíamos identificar todos los genes implicados en estos procesos, sino una serie de genes relevantes relacionados con el desarrollo y el estrés abiótico que permitieran avanzar en el conocimiento de dichos procesos. Con relación a genes implicados en caracteres del desarrollo, los trabajos realizados en el contexto del Programa de Mutagénesis Insercional han hecho factible la identificación varios mutantes de interés, entre los que cabe destacar a *Arlequín* (*Alq*), cuyo carácter más relevante es la conversión homeótica de los sépalos en órganos análogos a un fruto (Pineda *et al.*, 2010; Antón, 2012). En colaboración con el grupo del Dr. Lozano, se demostró que el gen etiquetado en el mutante insercional *Arlequín* era *TAGL1* (*TOMATO AGAMOUS LIKE 1*) y se comprobó que la mutación promueve un fenotipo de ganancia de función como consecuencia de la expresión ectópica de *TAGL1* (*ALQ/TAGL1*). El análisis funcional de este gen indicó su participación en el control genético del desarrollo reproductivo de tomate y su papel esencial como regulador positivo de la maduración del fruto (Giménez *et al.*, 2010). La caracterización fisiológica del mutante *Arlequín* permitió descubrir que tanto sus frutos como sus sépalos exhiben caracteres excepcionales de calidad tanto para el consumo en fresco (mayor contenido de glucosa, fructosa y licopeno) como sobre todo para procesado industrial (el contenido en sólidos solubles duplica al del WT). Por esta razón, además

de publicar el trabajo, se patentaron todas las aplicaciones derivadas del uso del mutante (WO 2010/070166 A1). Más recientemente, se ha demostrado que es necesaria la actividad transcripcional de *ALQ/TAGL1* para el adecuado desarrollo de la cutícula del fruto de tomate (Giménez *et al.*, 2015). Asimismo, se ha investigado sobre la función divergente de los genes *TAG1* y *TAGL1/ALQ* y el papel que desempeñan durante el desarrollo del fruto (Giménez *et al.*, remitido). Por citar otro ejemplo, los trabajos realizados en el contexto de este proyecto de Mutagénesis Insercional hicieron factible la identificación del mutante recesivo *eno* (*excessive number of floral organs*), que desarrolla frutos acostillados de enorme calibre. La mutación *eno* promueve un incremento significativo del tamaño del meristemo floral, lo que acontece a lo largo de los primeros estadios de la morfogénesis de la flor. Como consecuencia, las flores del mutante experimentan un aumento en el número de pétalos, estambres y carpelos. El aumento en el número de carpelos hace que los frutos de *eno* tengan tres veces más lóculos que los del WT (de 4,3 se pasa a 12,9), lo que a su vez conduce a un incremento del 40 % en el peso del fruto (Fernández-Lozano *et al.*, 2015). Un aspecto importante que conviene destacar es que el gen responsable de la mutación *eno* es el que mayor impacto tiene sobre el tamaño del fruto de tomate de todos los que se han descrito. El gen *ENO* se ha clonado recientemente en el laboratorio del Dr. Lozano y en el momento actual se está llevando a cabo su análisis funcional, lo que sin duda proporcionará avances en el conocimiento de la base genética de los procesos que regulan el tamaño del fruto de tomate.

Respecto a genes relacionados con la respuesta o tolerancia a estrés abiótico, en nuestro laboratorio se desarrolló hace algunos años un método de cultivo *in vitro* que ha permitido identificar diversos mutantes de tomate hipersensibles a la salinidad. Por ejemplo el mutante *sog-698* (*sodium gatherer*), que se caracteriza por exhibir una intensa clorosis foliar y evidentes síntomas de hiperhidratación *in vitro*. Tras realizar varios experimentos *in vivo* con el mutante se vio que el fenotipo de clorosis foliar aparecía a los pocos días del inicio del tratamiento salino y que, en estas condiciones, las plantas mutantes acumulaban más agua que las del WT, acorde con los síntomas de hiperhidratación observados *in vitro* (Garrido, 2009). Un análisis más exhaustivo

DISCUSIÓN

permitió comprobar que el mutante acumula significativamente más agua que el WT en folíolos, donde también se acumulan elevadas concentraciones de Na^+ (lo que explica la elevada clorosis). Sin embargo, en peciolo ocurre todo lo contrario, es decir, se acumula menos agua y Na^+ (Pineda *et al.*, 2011). También se ha comprobado que en condiciones salinas el mutante exhibe mayor tasa de transpiración y conductancia estomática, lo que explicaría el mayor flujo de agua desde la raíz hacia la parte aérea (Egea *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que el mutante podría tener alterado algún mecanismo relacionado con el transporte de agua desde la raíz hacia la parte aérea, así como alguno de los mecanismos naturales que utiliza el tomate para protegerse de la acumulación de iones tóxicos en hoja (Pineda *et al.*, 2011). Aunque por el momento se desconoce el origen de la mutación, se han iniciado los análisis moleculares para abordar la clonación del gen mutado. El método de cribado *in vitro* también permitió la identificación del mutante insercional de tomate *pms-916*. La caracterización genética y molecular de este mutante ha hecho factible recientemente la identificación del gen etiquetado. Los análisis realizados hasta la fecha indican que se trata de un gen estrechamente implicado en la respuesta a estrés. Más concretamente, el gen *PMS-916* (*PROTECTING MERISTEMS AGAINST SALINITY-916*) parece que desempeña un papel crucial en la integridad y protección del meristemo apical en condiciones salinas.

Por otro lado, recientemente se ha publicado el análisis funcional de un nuevo factor de transcripción tipo MYB relacionado con la tolerancia al estrés salino (Campos *et al.*, aceptado en *Plant Biotechnology Journal*), identificado a partir del mutante insercional *ars1* (*altered response to salt stress 1*). Los análisis realizados en condiciones salinas indicaron que el mutante acumulaba elevadas concentraciones de Na^+ . Un análisis más detallado indicó que la elevada concentración de Na^+ en hoja se debía a una mayor pérdida de agua vía transpiración, consecuencia de una mayor apertura estomática en el mutante bajo condiciones de estrés salino. En definitiva, los resultados que se están obteniendo en este proyecto demuestran la utilidad de la mutagénesis insercional como estrategia para la identificación de genes clave implicados en procesos del desarrollo o la respuesta al estrés abiótico.

2. GENERACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE LÍNEAS T-DNA EN TOMATE

Una de las aportaciones de esta Tesis Doctoral al Programa de Mutagénesis Insercional ha sido la generación de una colección de líneas de inserción por T-DNA en el cultivar de tomate Moneymaker. En concreto, se han generado 974 líneas T-DNA diploides y se han obtenido sus descendencias TG2. Sumando esta colección de líneas T-DNA con las obtenidas por otros miembros del laboratorio, en el contexto del Programa de Mutagénesis Insercional nuestro grupo se han generado unas 7000 líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de especies silvestres relacionadas (*S. pennellii*, *S. cheesmaniae* y *S. pimpinellifolium*), la mayor parte con una trampa de intensificadores.

Conviene indicar que uno de los aspectos cruciales de la mutagénesis insercional con T-DNA es la necesidad de obtener un elevado número de líneas para que haya una cierta probabilidad de detectar mutantes relevantes. Para ello, es necesario disponer de un método eficaz y reproducible de transformación genética. Afortunadamente, los trabajos realizados en nuestro laboratorio han permitido disponer de un método de transformación genética en tomate que proporciona una eficacia útil en torno al 20-25% (lo que supone obtener 20-25 plantas transgénicas diploides independientes, es decir, procedentes de eventos independientes de transformación, por cada 100 explantes inoculados). En este trabajo de investigación se han realizado 5 experimentos de transformación genética en los que, empleando 4462 explantes de cotiledón, se han obtenido 974 plantas transgénicas diploides, lo que supone una tasa útil de transformación del 21,83%. En la actualidad, otros componentes del grupo siguen ampliando la colección de líneas T-DNA de tomate y en sus experimentos las eficacias útiles de transformación también rondan el 20-25%, lo que confirma la reproducibilidad del método que se está empleando actualmente en el laboratorio.

Aparte de generar esta colección de líneas T-DNA, las plantas transgénicas se han transferido a invernadero con el doble objetivo de: i) obtener las progenies TG2 a fin de identificar mutaciones con efectos recesivos; y ii) llevar a cabo el cribado preliminar de la colección para detectar mutaciones con efectos dominantes, semidominantes o aditivos. La obtención de progenies TG2 está permitiendo la identificación de

DISCUSIÓN

mutantes recesivos con alteraciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo por parte de los miembros del grupo del Dr. Lozano de la Universidad de Almería. Asimismo, estas líneas TG2 se están utilizando por miembros de nuestro laboratorio para la identificación en cultivo *in vitro* de mutantes hipersensibles a la salinidad o alterados en el desarrollo temprano (Sibilla Sánchez, tesis doctoral en fase de lectura), mutantes hipersensibles al estrés hídrico (Marybel Jáquez, tesis doctoral en realización) o mutantes afectados en la respuesta morfogenética (Jorge Sánchez-López, tesis doctoral en realización).

Por lo que respecta a esta Tesis Doctoral, a lo largo del cribado de la colección (líneas TG1), hemos detectado 28 mutantes afectados en caracteres vegetativos y/o reproductivos. La mayor parte de estos mutantes exhiben efectos pleiotrópicos, lo que suele complicar la asignación de la función (o, mejor dicho, la inferencia en torno a la función) del gen mutado. Esto puede deberse a que el gen mutado esté implicado no en uno, sino en varios caracteres que afectan al desarrollo de la planta, aunque también puede ocurrir que la alteración de la expresión del gen mutado provoque cambios dramáticos en el nivel de expresión de otros genes que interactúan con dicho gen. Por otra parte, no se puede descartar que varias mutaciones confluyan en la misma planta consecuencia de la integración de varias copias de T-DNA (o de la combinación de eventos insercionales y somaclonales), y conjuntamente promuevan un amplio espectro de alteraciones fenotípicas. Otros autores también han observado este fenómeno en sus colecciones de mutantes. Por ejemplo, Menda *et al.* (2004) indicaron que el 48% de los mutantes de tomate obtenidos a través de mutagénesis por EMS y neutrones rápidos exhibían pleiotropía; y Miyao *et al.* (2007) indicaron que casi la mitad de los mutantes de arroz que identificaron estaban afectados en más de un carácter. En nuestro caso, más de la mitad de los mutantes que hemos detectado exhibían alteraciones en caracteres vegetativos y reproductivos.

A la hora de clasificar los mutantes, decidimos incluirlos en el apartado correspondiente al carácter del desarrollo (vegetativo o reproductivo) que, de forma más notable, había contribuido a su identificación, lo que no significa que el gen mutado esté implicado, al menos de forma directa, en aspectos relacionados con ese

carácter. Por tanto, en lo que respecta a nuestros mutantes, podría ocurrir que el gen alterado en un mutante adscrito al desarrollo vegetativo esté implicado realmente en el desarrollo floral o el desarrollo del fruto, o al contrario, es decir, que el gen alterado en un mutante adscrito al desarrollo reproductivo esté implicado en el desarrollo vegetativo. También podría ocurrir que el gen alterado interviniera en numerosos procesos del desarrollo de la planta, como ocurre con los que participan en rutas de señalización de reguladores del crecimiento. En definitiva, la adscripción de una mutación en una determinada categoría fenotípica no necesariamente indica el carácter controlado por el gen mutado.

Otro aspecto que nos resulta interesante resaltar es el elevado número de fenotipos relacionados con esterilidad o baja fertilidad, a saber, el 90% de los fenotipos detectados. Estos resultados son parecidos a los observados por otros autores (ver Menda *et al.*, 2004 o Miyao *et al.*, 2007) o a los que se obtuvieron en nuestro laboratorio con otra variedad de tomate (Angarita, 2009).

En este trabajo de investigación hemos centrado nuestra atención en mutaciones que conducen al desarrollo de fruto partenocárpico. Muchos de los fenotipos mutantes relacionados con esterilidad o baja fertilidad también exhibían desarrollo partenocárpico del fruto. En efecto, 15 de los 28 mutantes que se caracterizaron exhibían partenocarpia, mientras que en 5 mutantes la producción de semilla era muy escasa (de 3 a 70 semillas por planta y cosecha) respecto a lo que habitualmente se obtiene en el parental silvestre (800-900 por planta y cosecha). Habitualmente, los mutantes partenocárpicos descritos en la literatura suelen presentar algún tipo de alteración en etapas de la ruta de biosíntesis o señalización de reguladores de crecimiento (i.e. auxinas, giberelinas, citoquininas, y a veces etileno o ácido abscísico) (Mapelli *et al.*, 1978; Olimpieri *et al.*, 2007; Serrani *et al.*, 2010; Shinozaki *et al.*, 2015). Habida cuenta de que las fitohormonas intervienen en muchos procesos fisiológicos relacionados con el desarrollo vegetal, no se puede descartar que algunos de los mutantes que exhiben partenocarpia y otras alteraciones en el desarrollo vegetativo, tengan afectada la síntesis o señalización de alguna hormona. En el siguiente apartado discutiremos sobre la relación que podría existir entre los distintos fenotipos

partenocárpicos detectados y posibles alteraciones en los niveles de fitohormonas, todo ello sobre la base de las alteraciones que exhiben en el desarrollo vegetativo.

3. MUTANTES PARTENOCÁRPICOS Y ALTERACIONES EN EL DESARROLLO VEGETATIVO

La mayoría de los mutantes con desarrollo de fruto partenocárpico exhibieron alteraciones, más o menos severas, en caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo. Por ejemplo, en comparación con las hojas del WT, los mutantes *Tom209*, *Tom157*, *Tom1648*, *Tom654* y *Tom497* desarrollaron hojas de diferente morfología y textura, y menor número de folíolos o grado de complejidad en la arquitectura foliar (ver figura 100). Una posibilidad es que las alteraciones morfológicas de las hojas de estos mutantes se deban a cambios de expresión en genes tipo *KNOX*.

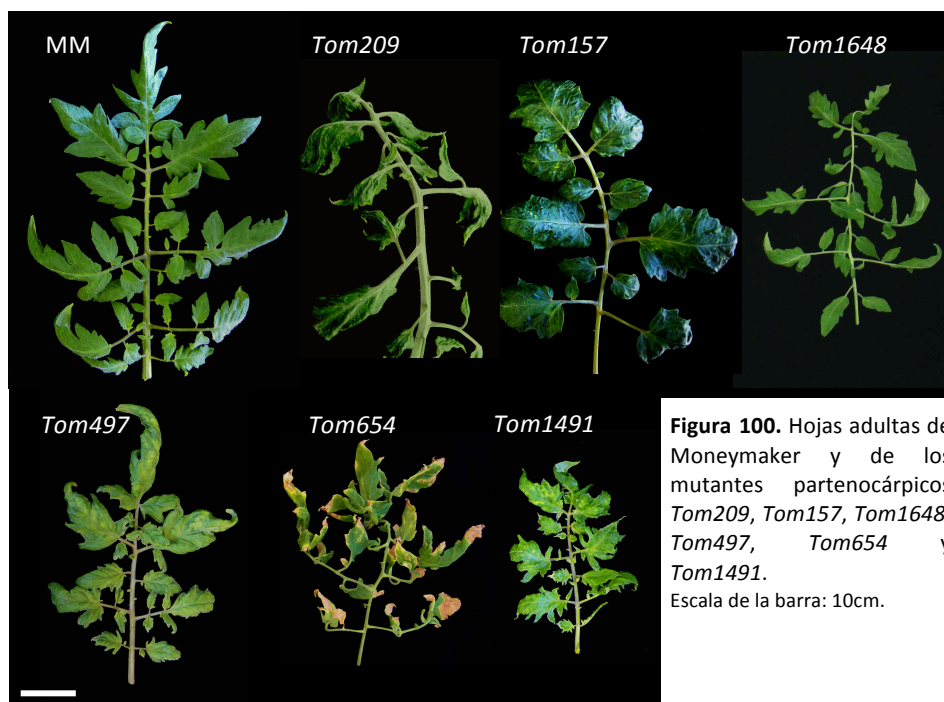


Figura 100. Hojas adultas de MoneyMaker y de los mutantes partenocárpicos *Tom209*, *Tom157*, *Tom1648*, *Tom497*, *Tom654* y *Tom1491*.

Escala de la barra: 10cm.

En tomate, se ha comprobado que el incremento en el grado de disección de la hoja, mediado por un mayor nivel de expresión de genes tipo *KNOX*, está relacionado con una reducción del nivel de expresión del gen *Le20ox1*, implicado en la biosíntesis de giberelinas (Hay *et al.*, 2002). De hecho, los mutantes *Mouse ears (Me)* y *Curl (Cu)*,

cuyas hojas presentan un mayor grado de disección, manifiestan una expresión ectópica de *LeT6/Tkn2* (un gen *KNOX* de clase I de tomate), y además exhiben una concomitante reducción de expresión del gen *GA20-OXIDASA*, es decir menores niveles de giberelina (Parnis *et al.*, 1997). Hay *et al.* (2002) demostraron que tanto la aplicación exógena de giberelinas como la señalización constitutiva de giberelinas (que exhibe el mutante de tomate *procera*) reducía el grado de disección de las hojas de tomate. Estos resultados indican que las giberelinas juegan un papel en la regulación de la complejidad de la hoja en tomate (Hay *et al.*, 2002, 2004). Por tanto, no se puede descartar que los mutantes *Tom209*, *Tom157*, *Tom1648*, *Tom654* y *Tom497*, todos ellos con menor grado de complejidad foliar, exhiban un incremento de los niveles de giberelinas, lo que a su vez promovería el desarrollo partenocárpico del fruto.

Por otro lado, las auxinas desempeñan un papel fundamental en el desarrollo vegetativo, ejerciendo una función sobre el control de la dominancia apical y, por ende, inhibiendo el desarrollo de las yemas axilares. Experimentos de genética molecular han permitido comprobar que las auxinas, que se sintetizan en las regiones meristemáticas de los ápices, desempeñan un papel importante durante el desarrollo inicial de los primordios de hoja (Bar y Ori, 2014). Se ha observado que la aplicación exógena de auxinas naturales en los flancos del SAM (*Shoot Apical Meristem*) conduce a la formación de nuevos primordios mientras que cuando se realizan tratamientos con inhibidores del transporte polar de auxinas no se desarrollan órganos laterales a partir del SAM (Cline, 1996; Reinhardt *et al.*, 2000, 2003; Vogler y Kuhlemeier, 2003). Según Scanlon (2003), las auxinas pueden ser requeridas para una regulación negativa de la expresión de genes tipo *KNOX* durante el desarrollo inicial de los primordios de hoja. Estos resultados sugieren que el balance auxina-*KNOX* es requerido para el desarrollo normal de la hoja de tomate, es decir, que mayores concentraciones de auxina podrían reducir el grado de complejidad de la hoja de tomate toda vez que los mayores niveles de expresión de *KNOX* aumentan el grado de disección foliar. El mutante de tomate *entire* desarrolla hojas simples, es decir, hojas con menor grado de disección foliar, y frutos partenocárpicos. Zhang *et al.* (2007) demostraron que el fenotipo *entire* se debe a la pérdida de función de un miembro de la familia génica

DISCUSIÓN

Aux/IAA, en concreto *S/IAA9*. Habida cuenta de que los genes *IAA* actúan como represores transcripcionales de la ruta de señalización de auxinas, la pérdida de función de *S/IAA9* da lugar a una expresión constitutiva de la ruta de respuesta a auxina. De hecho, Wang *et al.* (2005) habían demostrado que el silenciamiento de *IAA9* en tomate promueve el desarrollo partenocárpico del fruto y reduce el grado de disección foliar. En definitiva, el menor grado de disección foliar de los mutantes *Tom209*, *Tom157*, *Tom1648*, *Tom654* y *Tom497* podría estar también relacionado con mayores niveles endógenos de auxina, lo que promovería además el desarrollo partenocárpico del fruto.

Respecto al papel de las auxinas, las citoquininas parecen desempeñar un papel fisiológico opuesto a las auxinas en procesos relacionados con el desarrollo vegetativo, ya que las citoquininas son reguladores positivos del desarrollo de las yemas axilares. Estudios en *Arabidopsis* y en guisante han demostrado que tanto las aplicaciones exógenas de citoquininas como la sobre-expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de citoquininas conducen en general a la formación de yemas (King y Van Staden, 1988; Medford *et al.*, 1989). Respecto al desarrollo foliar, se ha demostrado que las citoquininas regulan la actividad morfogénica de las hojas compuestas de tomate (Shani *et al.*, 2010). Así, mayores niveles de citoquininas, producidas a través de la sobreexpresión específica del gen *AtIPT7* (implicado en la biosíntesis de citoquininas) en plantas transgénicas de tomate, condujeron a una mayor complejidad foliar (“hoja supercompuesta”) sobre la base de un crecimiento prolongado de las hojas. Shani *et al.* (2010) demostraron que una reducción de los niveles de citoquininas suprime el efecto que tienen las proteínas *KNOX* sobre la morfología foliar, lo que sugiere que en este proceso las citoquininas median en la actividad de las proteínas *KNOX*. De hecho, diversos trabajos han dado cuenta de la relación entre los niveles endógenos de citoquinina y la expresión de genes tipo *KNOX*. Por ejemplo, los fenotipos de expresión alterada de genes *KNOX* son similares a los de sobreexpresión de citoquininas (Estruch *et al.*, 1991; Sinha *et al.*, 1993). Asimismo, se ha comprobado que la sobreexpresión de genes tipo *KNOX* estimula la síntesis de citoquinina (Kusaba *et al.*, 1998; Frugis *et al.*, 1999; Ori *et al.*, 1999; Hewelt *et al.*,

2000). Además, Shani *et al.* (2010) comprobaron que debe de existir una interacción entre los niveles de auxinas y citoquininas para que se produzca el adecuado desarrollo compuesto de la hoja. De hecho, la aplicación exógena de auxinas en las plantas transgénicas de tomate que sobreexpresaban *AtIPT7* dio lugar al desarrollo de hojas simples y a la supresión del fenotipo de “hoja supercompuesta” (Shani *et al.*, 2010). Estos resultados parecen sugerir que los mutantes *Tom209*, *Tom157*, *Tom1648*, *Tom654* y *Tom497* no deben exhibir alteraciones en los niveles endógenos de citoquininas y que, probablemente, la menor complejidad foliar se deba a alteraciones en los niveles de auxinas o giberelinas.

Por otro lado, los mutantes *Tom497*, *Tom654* y *Tom1648* exhiben un desarrollo vegetativo más débil (e.g. tallos más delgados). Acorde con el menor grado de disección foliar consecuencia de un incremento de los niveles de giberelinas, no se puede descartar que el porte más débil de estos mutantes se deba a alteraciones en la ruta de señalización de las giberelinas. Se sabe que las giberelinas desempeñan un papel fundamental en el crecimiento vegetativo. Así, aplicaciones exógenas de giberelinas generan fenotipos de porte más débil, con tallos más delgados y alargados. En tomate se ha reportado que la alteración de la expresión de genes implicados en la síntesis de giberelinas modifica la arquitectura de la planta. Por ejemplo, Xiao *et al.* (2006) comprobaron que la anulación de función del gen *GA 20-oxidas*a (un potente regulador de la ruta de biosíntesis de giberelinas) en plantas transgénicas de tomate daba lugar a fenotipos de menor tamaño y con menor longitud internodal. Los niveles endógenos de giberelinas también se pueden alterar a través de modificaciones de las proteínas DELLA. De acuerdo con el modelo propuesto en *Arabidopsis*, la respuesta a giberelinas se encuentra bajo el control negativo de una familia de proteínas DELLA, en concreto RGA, GAI, RGL1, RGL2 y RGL3 (Peng *et al.*, 1997; Dill y Sun, 2001; Lee *et al.*, 2002; Wen y Chang, 2002). Martí *et al.* (2007) comprobaron que las plantas transgénicas de tomate que expresaban el alelo *Atgai^{del}* (*Arabidopsis thaliana gain-of-function DELLA*) exhibían una estructura vegetativa compacta, mientras que las silenciadas para el gen *SIDELLA* eran más altas, con tallos delgados y desarrollaban frutos partenocárpicos. El mutante *procera*, que exhibe un fenotipo de respuesta

constitutiva de giberelinas, es un mutante nulo para *DELLA* (Bassel *et al.*, 2008). Las plantas de fenotipo *procera* son más desgarradas, más altas, con tallos más delgados y hojas con lóbulos menos pronunciados que las de fenotipo silvestre, y desarrollan frutos partenocárpicos (Stubbe, 1957; Jones, 1987; Jupe *et al.*, 1988; Van Tuinen *et al.*, 1999). En definitiva, en los mutantes *Tom497*, *Tom654* y *Tom1648*, el menor grado de disección foliar, el porte más débil de las plantas y el desarrollo partenocárpico de los frutos podría estar relacionado con mayores niveles de giberelinas.

4. MUTANTES PARTENOCÁRPICOS Y ALTERACIONES EN EL DESARROLLO REPRODUCTIVO

Al caracterizar el fenotipo de los mutantes partenocárpicos se vio que los frutos tenían una morfología o tamaño diferente a los del WT. Por ejemplo, la morfología del fruto de los mutantes *Tom209* y *Tom1648* era cordiforme, la del fruto del mutante *Tom654* redondo-alargada y el de *Tom24* sensiblemente cordiforme. En todos los mutantes partenocárpicos también se observó que el calibre de fruto era inferior al del WT. En algunos, como *Tom209* y *Tom157*, el tamaño del fruto era significativamente menor, mientras que en otros mutantes, como *Tom24*, el tamaño era sólo un poco menor.

Hoy en día se conocen diversos genes de tomate que regulan la morfología o el tamaño del fruto. Así, la forma alargada del fruto de tomate está principalmente controlada por los tres *loci*, a saber, *ovate*, *sun*, y *fs8.1*. (Gonzalo & van der Knaap, 2008). *OVATE*, situado en el cromosoma 2, codifica un regulador negativo relacionado con el crecimiento de las plantas (Liu *et al.*, 2002). *SUN* codifica un miembro de la familia IQD de proteínas de unión a la calmodulina, y sus niveles de expresión están positivamente relacionados con la morfología alargada del fruto (Xiao *et al.*, 2008). La mutación *sun* procede de un evento de duplicación de 24.7 kb mediado por el retrotransposón *Rider* (Jiang *et al.* 2009). Se sabe que el locus *fs8.1* se encuentra situado en el brazo largo del cromosoma 8 (Sun *et al.*, 2015) y se ha sugerido que podría estar presente en un importante número de variedades de fruto alargado.

Según Sun *et al.* (2015), existen 12 posibles candidatos entre los que se encuentra una proteína implicada en la degradación de citoquininas (*Solyc08g061930*).

Por lo que respecta al calibre del fruto, las dimensiones finales dependen de diversos factores que pueden acontecer antes o después del estadio de antesis floral. *FW2.2/CNR* (por *Cell Number Regulator*) fue el primer QTL relacionado con tamaño de fruto que se identificó y caracterizó funcionalmente (Cong *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2010) y codifica para un regulador negativo de la división celular (Frary *et al.*, 2000; Nesbitt y Tanksley, 2001). Más recientemente, se ha clonado el gen *FW3.2*, asociado al segundo QTL más importante relacionado con el incremento del tamaño del fruto en tomate, y se ha comprobado que codifica un citocromo P450 perteneciente a la subfamilia CYP78A (Zhang *et al.*, 2012; Chakrabarti *et al.*, 2013). El análisis funcional del gen indicó que actúa como un regulador positivo del crecimiento del fruto, de forma que su expresión en tomate fomenta divisiones celulares extra durante el desarrollo y crecimiento del fruto, lo que conduce a un incremento de tamaño (Chakrabarti *et al.*, 2013). Ambos genes regulan el tamaño del fruto en etapas posteriores a la antesis floral y no se ha descrito que sus productos génicos interactúen con niveles de hormonas.

Otros genes reguladores del tamaño del fruto de tomate actúan en etapas previas a la antesis, como ocurre con los genes *LOCULE NUMBER (LC)* y *FASCIATED (FAS)*. El locus *lc* se debe a una mutación en la región reguladora del ortólogo del gen *WUS* de *Arabidopsis* (Muños *et al.*, 2011), mientras que la mutación *fas* afecta al promotor del gen ortólogo a *CLV3* en *Arabidopsis* (Xu *et al.*, 2015). Tanto *lc* como *fas* ocasionan un incremento del número de carpelos en el ovario durante la organogénesis floral. Recientemente, a partir del mutante *eno*, se ha identificado un nuevo gen (*ENO*) cuya alteración incrementa significativamente el tamaño del meristemo floral, dando lugar a frutos de mucho mayor calibre y con más contenido de carne (Fernández-Lozano *et al.*, 2015). Los tres genes (*LC*, *FAS* y *ENO*) intervienen en etapas previas al estadio de antesis de la flor y tampoco se sabe si sus productos génicos interactúan con niveles de hormonas.

No parece que ninguno de estos genes implicados en la morfología o el calibre del fruto se encuentre alterado en nuestros mutantes partenocárpicos. A tenor de los fenotipos, parece más razonable pensar que la morfología o el tamaño de los frutos de nuestros mutantes se deban a cambios en los niveles de hormonas. Por ejemplo, En frutos de plantas que expresan de manera específica auxinas en óvulos (*DefH9-iaaM*) se ha observado, además del fenotipo de partenocarpia, el desarrollo de frutos extremadamente cordiformes (Pandolfini *et al.*, 2002, Molesini *et al.*, 2009). Los autores atribuyen ese fenotipo a una extrema acumulación de auxinas. El silenciamiento de *SIARF7*, regulador negativo del cuajado del fruto que controla las respuestas a auxinas y giberelinas durante el inicio y desarrollo del fruto de tomate, también conduce al desarrollo de frutos partenocárpico de morfología cordiforme (de Jong *et al.*, 2009). Según los autores, la morfología alterada del fruto se debe a una intensa señalización por auxinas a lo largo del desarrollo del fruto, tal y como ocurre en los frutos tratados exógenamente con esta hormona. Se ha demostrado que el represor transcripcional de auxina *SI-IAA17* controla el tamaño del fruto regulando la expansión celular y procesos relacionados con endoreduplicación (Su *et al.*, 2014). Curiosamente, los frutos de plantas con el gen *SI-IAA17* silenciado son, en comparación con los del WT, de mayor calibre, con mayores niveles de ploidía y de morfología cordiforme.

Las alteraciones en los niveles de giberelinas también tienen efectos sobre la morfología del fruto. Por ejemplo, el silenciamiento de *PROCERA/SIDELLA*, que activa la ruta de señalización de giberelinas, promueve el desarrollo de frutos partenocárpicos que exhiben características similares a los que se obtienen mediante tratamientos con giberelinas (Marti *et al.*, 2007). Así, los frutos de las plantas transgénicas son de menor tamaño y más elongados que los de plantas WT. Asimismo, el mutante *procera*, que posee una mutación puntual en la región GRASS del gen *SIDELLA*, desarrolla frutos más pequeños con la morfología alterada.

El menor tamaño de los frutos en los mutantes partenocárpicos también podría estar relacionado con la ausencia de semillas. Por ejemplo, los frutos partenocárpicos inducidos mediante la aplicación de auxinas o giberelinas suelen ser de menor calibre

(Mapelli *et al.*, 1978), y se ha sugerido que este menor calibre podría deberse a la ausencia de semilla. De hecho, son diversos los autores que sugieren la existencia de una correlación positiva entre el tamaño de fruto y el número de semillas (Nitsch, 1970; Rylski, 1973; Varga y Bruinsma, 1976; Shipp *et al.*, 1994). Se sabe que el tamaño final del fruto depende principalmente del número y tamaño de las células (Varoquaux *et al.*, 2000; Cong *et al.*, 2002), es decir de la división y expansión celular. Según Gillaspay *et al.* (1993), el desarrollo del embrión controla la tasa de división celular de los tejidos que lo envuelven (Gillaspay *et al.*, 1993). También se ha descrito que las semillas en desarrollo promueven la expansión de las células del fruto al secretar reguladores de crecimiento (Gillaspay *et al.*, 1993; Srivastava y Handa, 2005). Por tanto, es posible que el embrión en desarrollo ejerza una cierta función sobre el calibre final del fruto. Por otro lado, como se discutirá en el siguiente apartado, no se puede descartar que, como en muchos de estos mutantes la tasa de cuajado de fruto es significativamente mayor que en el WT, el tamaño final del fruto se vea afectado debido al efecto sumidero. Todas estas evidencias explican que, en general, los frutos sin semilla poseen menor calibre que los frutos con semilla.

5. MUTANTES PARTENOCÁRPICOS Y ALTERACIONES EN LA TASA DE CUAJADO DE FRUTO

El desarrollo partenocárpico de un fruto representa una ventaja desde el punto de vista de la producción. En efecto, como el desarrollo normal de un fruto depende del éxito de la polinización y la fecundación (Guillaspi, 1993), las condiciones desfavorables para el desarrollo del polen o la fecundación conducen a una reducción de la producción. En tomate, como en otras especies, la extrema sensibilidad de la microsporogénesis es uno de los factores más limitantes para el desarrollo del fruto (Picken, 1984; Gorguet *et al.*, 2005). Así, condiciones de cultivo bajo temperaturas extremas, humedad e iluminación excesivas o escasas, y vientos de fuerte intensidad reducen drásticamente el cuajado del fruto (Howlett, 1939; Rick, 1978; George *et al.*, 1984). Por ello, los cultivares cuyo cuajado no depende de la polinización y de la fecundación tienen un evidente interés para el cultivo en condiciones adversas.

Además, en algunos de los mutantes caracterizados en esta Tesis Doctoral (i.e. *Tom24* y *Tom1648*) se pudo constatar que la tasa de cuajado de fruto era mayor que en el WT. Por ejemplo, el cuajado de fruto en los mutantes *Tom24* y *Tom1648* osciló en torno al 80%, mientras que sólo el 40% de las flores del WT dieron lugar a fruto. Esta alta tasa de cuajado se debe a que el fruto inicia su desarrollo en ausencia de polinización y fecundación. De hecho, algunos de los mutantes que se presentan en esta Tesis Doctoral (i.e. *Tom24* y *Tom1648*) inician el desarrollo de fruto en estadios previos a la antesis, que es el momento en el que se produce la polinización del pistilo. El desarrollo precoz del ovario se ha descrito en diversas líneas de tomate que exhiben desarrollo partenocárpico. Por ejemplo, los mutantes *pat* y *pat2* inician el crecimiento del fruto en estadios previos a la antesis, lo que se ha correlacionado con un incremento de los niveles de auxina y giberelina en ovarios (Fos y Nuez, 1996; Fos *et al.*, Mazzucato *et al.*, 1998; 2000; Hazra *et al.*, 2010). Asimismo, las líneas transgénicas de tomate que tienen silenciado el gen *IAA9*, un regulador negativo de la respuesta a auxinas de la familia *Aux/IAA*, exhiben crecimiento prematuro del fruto (Wang *et al.*, 2005), lo que indica que niveles elevados de auxina en estadios previos a la antesis promueven el desarrollo partenocárpico del fruto. Asimismo, en las flores del mutante *procera* y de las plantas transgénicas en las que se ha silenciado *PROCERA/SIDELLA* el crecimiento prematuro del ovario se inicia antes de la antesis (Marti *et al.*, 2007; Carrera *et al.*, 2012). Las flores de estas plantas exhiben, además, una marcada longistilia, al igual que ocurre con las flores de las plantas tratadas con giberelinas (Carrera *et al.*, 2012). Nosotros hemos visto que en el mutante *Tom1648* el inicio del desarrollo del fruto se produce en estadios previos a la antesis. Además, las flores de este mutante exhiben una marcada longistilia. Todo ello, unido a las alteraciones en el desarrollo vegetativo (i.e. porte más débil y menor grado de disección foliar) sugiere que *Tom1648* experimenta un fenotipo de respuesta constitutiva a giberelinas. En el mutante *Tom24* el cuajado partenocárpico de fruto resulta particularmente interesante. Este mutante no experimenta alteraciones en el desarrollo vegetativo y las flores son completamente normales (i.e. no exhiben longistilia o malformaciones). Sin embargo, el cuajado del fruto se inicia antes del estadio de antesis. El calibre de los frutos de *Tom24* es muy similar al de los frutos del WT, aunque los frutos del mutante

son sensiblemente cordiformes. No se puede descartar que, en este caso concreto, el mutante experimente un incremento en los niveles de auxina o giberelinas específicamente en fruto, o que estos incrementos sean tan sutiles que no alteren la arquitectura vegetativa de la planta pero sean suficientes como para inducir el inicio del desarrollo del fruto.

El calibre de los frutos partenocárpicos en los mutantes con alta tasa de cuajado podría ser dependiente de la relación fuente-sumidero. Según Li *et al.* (2015), el calibre de fruto depende del aporte de carbohidratos procedentes de los órganos fuente. La disponibilidad de carbohidratos que percibe cada fruto será, a su vez, dependiente de la cantidad de órganos sumidero que deban ser satisfechos. Por ejemplo, una práctica habitual en horticultura es la eliminación de frutos para favorecer el incremento del tamaño de los que quedan en la planta. La limitación de fotoasimilados producidos por los órganos fuente (i.e. hojas desarrolladas) es uno de los primeros factores que desencadenan el aborto de flores y frutos, que son los principales órganos sumideros (Reynolds *et al.*, 2009; Egli, 2010; Wubs *et al.*, 2011). Sin embargo, en plantas que desarrollan frutos partenocárpicos, como la tasa de aborto floral es menor, aumenta la competencia por los asimilados repercutiendo sobre el calibre final del fruto. El interés en un mutante partenocárpico no es tanto la reducción del calibre de fruto sino el aumento de la productividad. Por ejemplo, la tasa de cuajado del mutante *Tom24* duplica a la del cultivar del cual procede (i.e. MoneyMaker). Aunque peso medio de los frutos del mutante es menor que el de los frutos de MoneyMaker (39,4 g y 51,8 g respectivamente), la producción por planta a lo largo de las primeras 7 inflorescencias es casi el doble en el mutante (2,9 kg y 1,5 kg respectivamente). En definitiva, la mayor tasa de cuajado de los mutantes partenocárpicos, aunque afecta negativamente sobre el calibre final del fruto, puede repercutir positivamente sobre la productividad, es decir, sobre la producción final por planta.

6. MUTANTES PARTENOCÁRPCOS Y ANDROESTERILIDAD

Los mutantes partenocárpcos que hemos caracterizado en esta Tesis Doctoral, a saber, *Tom24*, *Tom157*, *Tom316*, *Tom497* y *Tom1648*, parecen exhibir androesterilidad citológica, es decir, la que se debe a anomalías a lo largo del proceso de microsporogénesis. En efecto, salvo en el caso del mutante *Tom316* que produce una cierta cantidad de polen viable, las dramáticas malformaciones de los granos de polen en los otros mutantes conducen a la ausencia de fertilidad del gameto masculino. Además de las alteraciones en la formación de los granos de polen, algunos mutantes (i.e. *Tom157*, *Tom316* y *Tom497*) también exhiben alteraciones en la formación de los sacos polínicos o en el desarrollo de la antera. No se puede descartar por consiguiente que exista una correlación entre la androesterilidad de estos mutantes y el desarrollo partenocárcico del fruto.

El desarrollo partenocárcico de fruto ligado a androesterilidad ha sido descrito por diversos autores. Según Mazzucato *et al.* (2015), la existencia de conos estaminales anómalos es frecuente en las líneas partenocárcicas de tomate. De hecho, Vivian-Smith *et al.* (2001) propusieron que las anteras podrían generar una señal represora hacia el ovario para inhibir su tendencia natural a crecer como fruto en el caso de que no se produzca la fecundación. Esta represión del crecimiento autónomo del ovario por las anteras debe de existir en estadios muy tempranos del desarrollo del estambre ya que la emasculación sin posterior polinización manual no da lugar en ningún caso al desarrollo partenocárcico del fruto. Se ha empleado el promotor *PsEND1* (que se expresa de forma específica en tejidos que conforman la arquitectura de la antera desde estadios tempranos del desarrollo) junto con el gen citotóxico *barnasa* para provocar la ablación celular temprana de las anteras (Roque *et al.*, 2007; Medina *et al.* 2013). Los autores reportan la obtención de plantas transgénicas de tomate (cv. Microtom, p73 y Moneymaker) androestériles que desarrollaban frutos partenocárcicos. También se ha descrito el desarrollo partenocárcico del fruto en plantas silenciadas para genes homeóticos, como es el caso de los genes *TM8* (Lifschitz *et al.*, 1993) y *TM29* (Ampomah-Dwamena *et al.*, 2002), ortólogos de los genes *SEPALLATA* de *Arabidopsis*, y cuyo silenciamiento promueve alteraciones en el tercer

verticilo floral. También se desarrollan frutos partenocárpicos en el mutante *stamenless*, que exhibe conversiones homeóticas en los estambres consecuencia de una mutación en un gen de clase B (Gómez *et al.*, 1999; de Martino *et al.*, 2006; Quinet *et al.*, 2014). El desarrollo de frutos sin semilla en plantas con mutaciones homeóticas también se ha visto en otras especies. Así, en manzano, la mutación en el gen *MdPI*, el ortólogo del gen *PISTILLATA (PI)* de *Arabidopsis*, promueve la conversión de pétalos en sépalos y de estambres en carpelos, así como el desarrollo de frutos partenocárpicos (Yao *et al.*, 2001).

La relación entre partenocarpia y esterilidad morfológica, es decir, la debida a malformaciones en el tercer verticilo floral, ha sido ampliamente descrita. Sin embargo, no existe mucha información sobre la partenocarpia consecuencia de la esterilidad citológica. En este contexto, se ha reportado la obtención de frutos partenocárpicos en plantas transgénicas de uva que sobreexpresan un gen que codifica estilbeno sintasa, una enzima necesaria para la síntesis de resveratrol (Ingrosso *et al.*, 2011). Los autores pudieron relacionar el desarrollo partenocárpico con las anomalías que presentaban los granos de polen de estas plantas transgénicas, y dichas anomalías con la reducción significativa de ácido ferúlico, precursor de la ruta biosintética de la esporopolenina, un politerpeno impermeable que se encuentra en la exina del grano de polen.

Como se ha discutido en apartados anteriores, muchos de los fenotipos vegetativos y reproductivos de nuestros mutantes aluden a cambios en los niveles de fitohormonas. Diversos autores han estudiado el importante papel que desempeñan diversas hormonas sobre el desarrollo del polen (revisado por Paupière *et al.*, 2014). Se ha demostrado que el bloqueo de la ruta biosintética de las auxinas (i.e. mutantes de pérdida de función *yuc*) o mutaciones en genes que codifican receptores de auxina (i.e. *tir1*) promueven fallos o alteraciones en el desarrollo normal del polen (Cheng *et al.*, 2006; Cecchetti *et al.*, 2008, 2013). Recientemente se ha comprobado que la expresión de un miembro de la familia *ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR17 - ARF17)* es esencial para el desarrollo del polen de *Arabidopsis* (Yang *et al.*, 2013). El desarrollo vegetativo del mutante *arf17* es normal pero exhibe esterilidad masculina. Los autores

del trabajo han comprobado que en las plantas mutantes la señalización de auxinas se encuentra alterada. Los autores sugieren que *ARF17*, junto con otros miembros de la familia *ARF*, podrían actuar reprimiendo la transcripción de genes de respuesta temprana a auxinas.

Huang *et al.* (2003) analizaron el efecto de las citoquininas y de las giberelinas sobre el desarrollo del androceo de maíz, tabaco y *Arabidopsis*. Mediante técnicas de expresión localizada en los tejidos reproductivos, los autores comprobaron que mayores niveles de *CKX1*¹ conduce a esterilidad masculina, alteración que se puede revertir mediante la aplicación de quinetina y tidiazurón. De forma similar, la expresión de *gai*² en anteras y polen compromete la formación de estos órganos. Por otro lado, las giberelinas desempeñan un papel muy importante en la formación del grano de polen. Estudios recientes en *Arabidopsis* han puesto de manifiesto la importancia de la expresión de *DELLA*³ sobre el desarrollo del polen (Plackett *et al.*, 2014). Así, se ha visto que mutaciones en dos miembros de la familia DELLA, a saber, *REPRESSOR OF ga1-3 (RGA)* y *GA INSENSITIVE (GAI)*, promueven el colapso de los granos de polen. También se ha comprobado que la reducción de los niveles de giberelinas activas en la planta, consecuencia de bajas temperaturas, altera el desarrollo del grano de polen (Sakata *et al.*, 2014). Asimismo, se ha observado que la co-supresión de *GA20ox1* reduce la proporción de polen viable consecuencia de alteraciones antes, durante y después de la meiosis del gameto masculino (Olimpieri *et al.*, 2011).

Estos resultados indican que alteraciones en los niveles hormonales (i.e. auxinas o giberelinas) afectan el adecuado desarrollo del polen. Salvo en el caso de *Tom316* que produce una proporción considerable de polen viable, los mutantes partenocárpico caracterizados en esta Tesis Doctoral exhiben alteraciones en la formación del grano de polen en estadios tempranos del desarrollo de la flor (i.e. botón floral). No se puede descartar que alteraciones en las concentraciones de hormonas que pudieran exhibir

¹ *CKX1* es un gen implicado en la degradación de las citoquininas

² *gai* es un gen implicado en la transducción de señales de GAs

³ Los miembros de la familia DELLA actúan como represores negativos de la respuesta a giberelinas

estos mutantes también afecten al desarrollo del polen. Por lo que respecta al mutante *Tom316*, toda vez que produce una proporción considerable de polen viable y no parece tener alterada la viabilidad de sus óvulos, una posible explicación en torno al desarrollo de frutos sin semilla podría ser la existencia incompatibilidad entre sus gametos, lo que impediría la formación de semillas proveniente de la autofecundación.

7. MUTANTES PARTENOCÁRPICOS Y DESARROLLO DE LOS ÓVULOS

A excepción de *Tom1648*, ninguno de los mutantes con fruto partenocárpico parecen presentar alteraciones en el desarrollo de los óvulos, al menos desde un punto de vista morfológico. Un aspecto que nos resultó curioso en algunos de estos mutantes es la presencia de rudimentos seminales en el lugar donde deberían estar las semillas, rudimentos que alcanzan un tamaño considerable en el caso del mutante *Tom1648* (figura 101). Estos resultados parecen sugerir que los óvulos no fecundados no degeneran completamente y prosiguen su desarrollo durante un cierto periodo de tiempo.

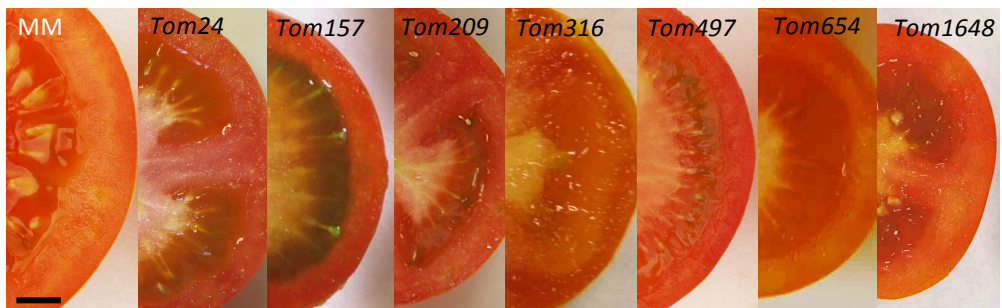


Figura 101. Detalle de un corte transversal de fruto en Moneymaker y en los mutantes partenocárpicos *Tom24*, *Tom157*, *Tom209*, *Tom316*, *Tom497*, *Tom654* y *Tom1648*. Escala de la barra: 5m.

Una hipótesis es que el desarrollo anormal de estos óvulos en estadios coincidentes con preantesis o antesis desencadene señales que promuevan el inicio del desarrollo del fruto, acorde con el modelo que propone la secreción de señales hormonales desde la semilla hacia el fruto (Mapelli *et al.*, 1978; Ozga *et al.*, 2002). Otra posibilidad es que el desarrollo del fruto independiente de polinización promueva el desarrollo de embriones haploides durante un periodo de tiempo determinado.

La formación de frutos con óvulos capaces de desarrollarse en ausencia de fecundación se ha observado en algunos mutantes de *Arabidopsis*. Los mutantes *fertilization-independent endosperm (fie)*, *fertilization-independent seed1 (fis1)*, *fis2* y *fis3* son capaces de desarrollar el endospermo y el tegumento en ausencia de fecundación (Ohad *et al.*, 1996; Chaudhury *et al.*, 1997). Por ejemplo, la mutación *fie* altera específicamente la célula central, pero no afecta a la nucela, al endospermo o al ovocito, lo que indica que los procesos que controlan la embriogénesis y la formación del endospermo son distintos.

Seavey *et al.* (2000) observaron en *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) el desarrollo de óvulos no fecundados cuando se encontraban en presencia de otros óvulos fecundados. Los autores sugieren que el desarrollo de los óvulos no fecundados se debería a una difusión de hormonas procedente de los óvulos fecundados. Acorde con esta hipótesis, podría ocurrir que los óvulos no fecundados recibieran señales procedentes de los tejidos del ovario, que en el caso de los mutantes partenocárpicos, podrían contener elevadas concentraciones de auxina o giberelina.

En tomate se ha observado la presencia de estructuras que podrían calificarse como pseudo-embriones en frutos partenocárpicos del mutante *pat2* (Kataoka *et al.*, 2003). También se han observado en frutos tratados con auxinas (Serrani *et al.*, 2007a) y en los frutos de líneas transgénicas que sobreexpresan genes implicados en la síntesis de auxinas (*iaaM*) o en la respuesta a auxinas (*rolB* y *ARF8*) (Goetz *et al.*, 2007; Martinelli *et al.*, 2009). Según Kataoka *et al.* (2003), estas estructuras son el resultado de la división de células de la parte interna del tegumento y asumen el papel de sustitución de las semillas para estimular el crecimiento del fruto. Acorde con esta hipótesis, el mutante *fruit without fertilization (fwf; arf8-4)* de *Arabidopsis* desarrolla frutos partenocárpicos (Goetz *et al.*, 2006). Cuando esta mutación se combina con *aberrant testa shape (ats)*, que contiene un solo integumento, las plantas desarrollan mayor número de frutos partenocárpicos, lo que sugiere que la modificación del integumento del óvulo tiene algún efecto sobre el desarrollo partenocárpico del fruto

(Vivian-Smith *et al.*, 2001). Asimismo, el doble mutante *fwf bel1*⁴ produce más frutos partenocárpicos que *fwf* (Vivian-Smith *et al.* 2001).

Merece especial atención lo que ocurre en el mutante *Tom1648*. Los análisis histológicos muestran que en cualquier estadio de desarrollo del ovario, el tamaño de los óvulos del mutante es siempre significativamente mayor que el de los óvulos WT, consecuencia de un mayor número de células. Esta hipertrofia de los óvulos podría explicar la imposibilidad de ser fecundados por polen de plantas WT. A su vez, no se puede descartar que esta hipertrofia esté causada por un desequilibrio hormonal que conduce, en combinación con el desarrollo anómalo del polen, al elevado número de frutos partenocárpicos que se desarrollan en este mutante.

8. INFERENCIAS EN TORNO A LA BASE DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DELATOR Y LA INSERCIÓN DEL T-DNA

Los programas de mutagénesis insercional basados en el empleo de ‘trampas génicas’ proporcionan resultados más eficientes respecto al uso de vectores convencionales (Springer, 2000). La ventaja estriba en su naturaleza dual, ya que, como cualquier otro T-DNA, las trampas generan mutaciones de inserción, pero además, si se insertan en la orientación correcta, el gen delator queda bajo control de los elementos de regulación del gen endógeno. De esta forma, no sólo se puede inferir la función del gen a través de la caracterización fenotípica del mutante, sino que además, analizando la expresión del delator, se obtiene el patrón de expresión espacio-temporal del gen etiquetado. Entre los distintos tipos de trampas que se pueden emplear (i.e. *gene trap*, *promotor trap* y *enhancer trap*), nosotros nos decantamos en su día por el empleo de una trampa de intensificadores (el T-DNA contiene, aparte del gen marcador de la β -glucuronidasa-GUS, un promotor mínimo formado por la caja TATA + el inicio de transcripción fusionado a la región estructural del gen *UidA*). Para que funcione, basta con que se inserte en el área de actuación de un intensificador, por lo que el número de genes que se detectan es mayor. El inconveniente estriba en que, como puede funcionar a una distancia considerable, a la

⁴ En el mutante *bel1* los integumentos del óvulo se convierten en estructuras carpeloides.

DISCUSIÓN

hora de clonar el gen, el esfuerzo requerido puede ser mayor. Para eludir este problema, nosotros decidimos analizar la expresión de delator en genotipos que exhibieran un fenotipo alterado. A partir de ahí se interpretan los análisis de expresión teniendo presente las alteraciones que exhibe el mutante.

En ocasiones conviene ser cautos a la hora de tratar de establecer una correlación entre la expresión del gen delator y el efecto del gen mutado. Por ejemplo, en algunas plantas transgénicas se pueden insertar varios T-DNAs y la expresión del delator no tiene por qué corresponder con el causante de la mutación. Así, si todos los insertos de una planta con varias copias de T-DNA son funcionales y se han integrado en el área de actuación de intensificadores diferentes, la actividad GUS de la planta analizada podría ser el resultado de la expresión de varios genes endógenos.

Aún así, la expresión GUS debería revelar la del gen mutado, de forma que la expresión se reflejaría de manera más o menos clara en los caracteres alterados. Los análisis que nosotros hemos realizado con nuestros mutantes así lo indican. Por ejemplo, el mutante *Tom654* exhibió alteraciones en la arquitectura vegetativa y síntomas severos de senescencia foliar en hojas desarrolladas. El análisis del delator en este mutante permitió observar que la expresión GUS se detectaba en tallo y hojas desarrolladas pero no en órganos jóvenes. En el mutante *Tom1491*, que contiene al menos dos insertos, se produce la caída prematura de las flores en estadios anteriores a la antesis y la expresión del delator se detecta claramente en la zona de abscisión del pedicelo floral (zona AZ). Este mismo patrón de expresión se detecta en el mutante *Tom1648* (que contiene 3 insertos), cuyos frutos se desprenden de la inflorescencia en estadios de verde maduro y pintón. Conviene indicar que en este mutante también se detecta expresión en otras zonas de abscisión: la unión del fruto con el cáliz y la región que une el fruto con el estilo, lo que podría indicar que el gen etiquetado desempeña alguna función en diferentes zonas de abscisión de las estructuras reproductivas. Además, las flores de este mutante exhiben una marcada longistilia. El análisis del delator en flores en diferentes estadios del desarrollo revela una intensa expresión GUS en los estilos.

Asimismo, los granos de polen de los mutantes *Tom24*, *Tom316* y *Tom1648*

degeneran en estadios más o menos tempranos del desarrollo floral y en los tres mutantes se detecta expresión GUS en las anteras de la flor. En el caso del mutante *Tom1648*, la expresión se detecta sólo en estadios de botón floral. Curiosamente, en este mutante se detectó mediante histología que las alteraciones en el desarrollo de los granos de polen ya ocurren en estos estadios, así como en los estadios de preantesis y antesis, donde los granos de polen ya se encuentran completamente atrofiados. Por el contrario, en los mutantes *Tom24* y *Tom316* las alteraciones en el desarrollo de los granos de polen no se detectan claramente hasta el momento en el que la flor alcanza el estadio de preantesis, momento a partir del cual se detecta la expresión GUS.

También parece que existe una correlación entre la expresión GUS y el desarrollo del fruto en algunos mutantes. Así, el mutante *Tom497*, cuyos frutos poseen un pericarpio muy delgado, exhiben una intensa expresión GUS en la pared del ovario de flores en diferentes estadios de desarrollo y en el pericarpio del fruto, siendo la expresión más intensa en el exocarpo y el endocarpo. Los frutos del mutante *Tom1648*, cuya morfología es completamente distinta a la de los frutos WT, exhiben una intensa y ubicua expresión GUS en los diferentes estadios de desarrollo. Algo similar ocurre en el mutante *Tom654*, ya que la morfología del fruto viene determinada por cambios en la morfología del ovario de la flor. En este mutante la intensa expresión GUS no sólo se ve en frutos sino que también se detecta en el ovario de la flor.

En relación con el fruto, conviene indicar que en el WT, a partir del estadio de fruto verde inmaduro de aproximadamente 2,5 cm de diámetro, se detectan falsos positivos GUS (i.e. una actividad GUS endógena no debida a la presencia de un gen delator en un T-DNA). En estos frutos la actividad GUS es fuerte en semillas en desarrollo, mientras que en las demás partes del fruto la intensidad es baja o moderada dependiendo del estadio de desarrollo en el que se encuentre el fruto. En general, en estadios avanzados del desarrollo del fruto la intensidad de la falsa actividad GUS es mayor. Conviene indicar que también se detectó cierta actividad endógena GUS en la zona de abscisión del pedicelo del fruto en los estadios pintón,

rosa y rojo maduro. Con respecto a la interpretación de los patrones de expresión en fruto o en la zona de abscisión del pedicelo en algunos de nuestros mutantes, la alta intensidad GUS y el hecho de que la expresión se produzca justo en el lugar en el que se detecta la alteración fenotípica nos hace pensar que la tinción GUS realmente refleja el patrón de expresión del gen alterado en el mutante.

Respecto a la naturaleza de las mutaciones (insercionales *versus* somaclonales) en los mutantes que se presentan en esta Tesis, los análisis que hemos realizado no nos han permitido confirmar si alguno de ellos es de tipo insercional. Los análisis de expresión del delator parecen sugerir que alguno de los mutantes podría ser insercional. Es el caso, por ejemplo, del mutante *Tom1648*, en el que la expresión del delator se detecta con mucha intensidad justo en los tejidos u órganos (estilo, zona de abscisión y parte interna del fruto) donde se aprecian las principales alteraciones fenotípicas (longistilia, abscisión en la etapa de pintón y fruto apuntado o cordiforme). Algo similar ocurre con otros mutantes como *Tom654* o *Tom1491*, cuyas alteraciones parecen estar relacionadas con la expresión del delator. De hecho, en estos mutantes la expresión del delator sugiere que el gen alterado se encuentra etiquetado por un T-DNA.

En cualquier caso, para estar seguros de que un T-DNA es el responsable de un fenotipo mutante es necesario realizar un análisis de co-segregación en la progenie. En mutantes de naturaleza dominante, semidominante o aditiva, la manera más rápida de llevar a cabo el análisis de co-segregación consiste en evaluar la progenie resultante del retrocruce con el WT. De hecho, teniendo en cuenta que nuestros mutantes producen frutos partenocárpicos, el cruzamiento con plantas WT es la única forma de obtener progenie. Es más, como el polen de la mayor parte de estos mutantes es inviable, la única vía es realizar el retrocruce empleando polen del parental silvestre. En el caso de los mutantes *Tom654*, *Tom1491* y *Tom1648* este análisis genético no se ha podido llevar a cabo ya que, por causas distintas, la progenie de retrocruce no se ha podido obtener. En el caso de estos mutantes no queda otro remedio que clonar las secuencias flanqueantes de los insertos, identificar a qué genes corresponden y analizarlos funcionalmente para comprobar si su silenciamiento y sobreexpresión

generan un fenotipo similar al del mutante.

En otros mutantes sí que se ha conseguido la progenie de retrocruce; sin embargo, sus fenotipos no se han detectado en la descendencia de retrocruce. Por ejemplo, en el mutante *Tom497* los análisis Southern indicaron que la línea mutante contenía dos insertos y el análisis en medio con kanamicina de plantas de la progenie BC1 indicó que no había razón para dudar de una segregación acorde con el número de insertos detectado por Southern (3 resistentes a kanamicina : 1 sensible a kanamicina). Inicialmente, las plantas en invernadero no dieron fenotipo, pero la reintroducción de estas plantas a condiciones de cultivo *in vitro* y la transferencia de nuevo a condiciones de invernadero permitió visualizar el fenotipo mutante en plantas de la progenie. Nuestra hipótesis es que la ausencia de transmisión del fenotipo mutante a la progenie de retrocruce podría deberse a interacciones genotipo-ambiente. En cuanto sea factible, se van a repetir estos experimentos para corroborar esta hipótesis.

En el mutante *Tom24* tampoco se visualizó el fenotipo mutante en las plantas de la progenie BC1. En este mutante, los análisis Southern indicaron la integración de 3 insertos de T-DNA. El análisis de las plantas de la progenie BC1 en medio con kanamicina indicó que no había razón para dudar de una segregación acorde con el número de insertos detectado por Southern (7 resistentes a kanamicina : 1 sensible a kanamicina). Sin embargo, el análisis de los resultados indicó que tampoco había razones para dudar de una segregación acorde con la integración de dos copias de T-DNA (3 resistentes a kanamicina : 1 sensible a kanamicina). Habida cuenta del interés que suscitaba este mutante, se analizaron mediante Southern todas las plantas BC1 (23 en total) y se vio que uno de los tres T-DNAs no se encontraba en ninguna de las plantas analizadas. Nuestra hipótesis es que el fenotipo mutante se debe a un inserto de T-DNA que, por la razón que sea, provoca letalidad en ambos tipos de gametos (i.e. ♂ y ♀) y que por tanto no se transmite a la descendencia. Si nuestra hipótesis es correcta, este es el inserto responsable del fenotipo. Actualmente, en el laboratorio del Dr. Lozano se está tratando de amplificar por Anchor-PCR las secuencias que flanquean a dicho inserto a fin de llegar a identificar el gen alterado en el mutante.

CONCLUSIONES

1. Se han generado 974 líneas T-DNA diploides de tomate con una trampa de intensificadores (vector pD991) y se han obtenido sus correspondientes progenies TG2. Con el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha ampliado la colección de líneas T-DNA de tomate del Programa de Mutagénesis Insercional, lo que permitirá seguir avanzando en la disección genética de caracteres relevantes a nivel agronómico en esta especie.
2. La evaluación preliminar en TG1 de las líneas T-DNA ha hecho factible la identificación de 28 mutantes de naturaleza dominante o semidominante afectados en el desarrollo vegetativo y reproductivo. El 64% de estos mutantes se encuentra alterado en una amplia gama de caracteres vegetativos y reproductivos, es decir, exhiben efectos pleiotrópicos. Además, diversos mutantes exhiben esterilidad o baja fertilidad, y en algunas de ellos el cuajado de fruto se produce en ausencia de polinización. Por la relevancia del carácter, en esta Tesis Doctoral hemos centrado nuestra atención en mutantes que presentan desarrollo partenocárpico del fruto. En concreto, se ha llevado a cabo la caracterización de 5 mutantes partenocárpicos, a saber, *Tom24*, *Tom157*, *Tom316*, *Tom497* y *Tom1648*.
3. La mayoría de los mutantes con desarrollo de fruto partenocárpico exhibieron alteraciones más o menos severas en caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo. Algunas líneas tenían un porte débil y tallos más delgados, así como alteraciones en la textura y arquitectura de las hojas. Nuestra hipótesis es que estos cambios en el desarrollo vegetativo podrían deberse a incrementos endógenos en los niveles de auxinas y giberelinas, lo que podría estar relacionado con la partenocarpia del fruto, que vincula el inicio del desarrollo del fruto en ausencia de polinización con incrementos en los niveles de estas hormonas.

CONCLUSIONES

4. La morfología del fruto de algunos mutantes partenocárpicos era cordiforme o redondo-alargada, similar a la que tienen los frutos de líneas con intensa señalización por auxinas y/o giberelinas, así como los frutos tratados exógenamente con estas hormonas. En conjunto, las alteraciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo sugieren que el desarrollo partenocárpico del los frutos de la mayoría de nuestros mutantes se debe, en parte, a una mayor acumulación de auxinas y/o giberelinas.
5. La tasa de cuajado de fruto en algunos de los mutantes que hemos caracterizado (e.g. *Tom24* y *Tom1648*) fue significativamente mayor que la del WT. Este incremento se sustentaba principalmente en un cuajado prematuro independiente de polinización, ya que en estos mutantes el inicio del desarrollo del fruto se producía antes del estadio de antesis, lo que minimizó la reducción del cuajado en condiciones no óptimas para la polinización y fecundación del ovario. Además, en el mutante *Tom24* se comprobó que, aunque el peso medio de los frutos es menor debido probablemente a la ausencia de semillas y a un efecto fuente-sumidero, la producción media por planta era significativamente mayor.
6. La histología de flores en diferentes estadios de desarrollo parece indicar que los mutantes *Tom24*, *Tom157*, *Tom497* y *Tom1648* exhiben androesterilidad citológica, es decir, la que se debe a anomalías a lo largo del proceso de microesporogénesis. Además, los mutantes *Tom157*, *Tom316* y *Tom497* exhiben alteraciones en la formación de los sacos polínicos o en el desarrollo de la antera. Acorde con la hipótesis basada en la acción represora de las anteras sobre el crecimiento autónomo del ovario en ausencia de fecundación, no se puede descartar que una de las causas del desarrollo partenocárpico del fruto sea la androesterilidad de estos mutantes.
7. Se ha analizado la existencia de actividad endógena tipo GUS en diferentes órganos vegetativos y reproductivos del parental silvestre (cv. *MoneyMaker*). Se ha constatado la ausencia de actividad GUS en diversos órganos vegetativos (e.g. raíz, tallo, peciolo, raquis o limbo de la hoja) en distintos

estados del desarrollo (e.g. tejido joven o adulto). De forma similar, se ha constatado la ausencia de actividad GUS en los cuatro verticilos de flores en etapas de botón floral, preantesis, antesis y post-antesis. En fruto, no se detectó actividad GUS hasta un estadio de verde inmaduro de unos 2 cm de diámetro. Sin embargo, a partir del estadio de verde inmaduro de aproximadamente 2,5 cm de diámetro se detecta una leve actividad GUS que aumenta con el desarrollo del fruto. Asimismo, se detecta cierta actividad GUS en la zona de abscisión del pedúnculo del fruto en los estadios pintón, rosa y rojo maduro. Estos resultados aconsejan una cierta cautela a la hora de interpretar los patrones de expresión del delator en frutos de los mutantes.

8. El análisis de la expresión del delator *UidA* en los mutantes partenocárpicos indica una estrecha relación entre la expresión GUS y las alteraciones fenotípicas de algunos mutantes. Es el caso de los mutantes *Tom1648*, que expresa el delator con intensidad en diferentes zonas de abscisión del fruto, el estilo de la flor o el fruto; *Tom497*, que experimenta una intensa tinción GUS en la pared del ovario de flores en diferentes estadios de desarrollo así como en el pericarpio del fruto; y *Tom24* que exhibe expresión del delator en granos de polen. Estos resultados sugieren que, en alguno de estos mutantes, el gen responsable del fenotipo se encuentre etiquetado por un T-DNA.
9. El análisis fenotípico de la progenie procedente del retrocruce entre el mutante *Tom24* (♀) y *Moneymaker* (♂) indica que el fenotipo mutante no se hereda en la descendencia. Un análisis más exhaustivo a nivel genético y molecular (Southern) ha permitido identificar un inserto de T-DNA que, si bien está presente en la línea original, está ausente en todas las plantas de la progenie. Los resultados sugieren que este T-DNA, que podría ser la causa del fenotipo mutante, provoca letalidad en ambos tipos de gametos (i.e. ♂ y ♀), razón por la cual el fenotipo mutante no se hereda.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelrahman M. (1977)** Patterns of hormones, respiration and ripening enzymes during development, maturation ripening of cherry tomato fruits. *Physiologia Plantarum*, 39: 115-118.
- Achard, P., Baghour M., Chapple A., Hedden P., Van der Straeten D., Genschik P., Moritz T., Harberd N.P. (2007)** The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 6484–6489.
- Adams–Phillips L., Barry C., Giovannoni J. (2004)** Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends in Plant Science*, 9: 331–338.
- Agarwal S., Rao A.V. (2000)** Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal*, 163: 739-744.
- Ahuja M.R. and Fladung M. (2014)** Integration and inheritance of transgenes in crop plants and trees. *Tree Genetics and Genoms*, 10: 779-790.
- Al-Hammadi, Sreelakshmi Y., Negi S., Siddiqi I., Sharma R. (2003)** The *polycotyledon* mutant of tomato shows enhanced polar auxin transport. *Plant Physiology*, 133: 113–125.
- Allen K.D. y Sussex I.M. (1996)** *Falsiflora* and *anantha* control early stages of floral meristem development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Planta*, 200: 254-264.
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry Ch.C., Ecker J.R. (2003)** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 301: 653–657.
- Alvarado M.C., Zsigmond L.M., Kovács I., Cséplő A. , Koncz C., Szabados L.M. (2004)** Gene trapping with *Firefly Luciferase* in *Arabidopsis*. Tagging of stress-responsive genes. *Plant Physiology*, 134: 18–27.
- Ampomah-Dwamena C., Morris B.A., Sutherland P., Veit B., Yao J. L. (2002)** Down-Regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiology*, 130: 605–617.
- An G., Lee S., Kim S.H., Kim S.R. (2005)** Molecular genetics using T-DNA in rice. *Plant Cell Physiology*, 46: 14–22.
- An S., Park S., Jeong D.H., Lee D.Y., Kang H.G., Yu J.H., Hur J., Kim S.R., Kim Y.H., Lee M., Han S., Kim S., Yang J., Kim E., Wi S. J., Chung S. H., Hong J. P., Choe V., Lee H.K., Choi J.H., Nam J., Kim S.R., Park P.B., Park K.I., Kim W.T., Choe S., Lee Ch.B., An G. (2003)** Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice. *Plant Physiology*, 133: 2040–2047.
- André D., Colau D., Schell J., Montagu M.V., Hernalsteens J.P. (1986)** Gene tagging in plants T-DNA insertion mutagen that generates *APH* (3') II-plant gene fusions. *Molecular and General Genetics*, 204: 512–518.
- Angarita M.P. (2009)** *Generación de líneas T-DNA de tomate (Solanum lycopersicum cv. P73) e identificación de mutantes de inserción*. Universidad Politécnica de Valencia, España.

- Angenent G.C., Franken J., Busscher M., Van Dijken A., Van Went J.L., Dons H.J., Van Tunen A.J. (1995) A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. *Plant Cell*, 7: 1569–1582.
- Antón T. (2012) La caracterización del mutante insercional *Arlequín* revela que el gen etiquetado tiene un papel clave en el desarrollo reproductivo de tomate. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Ariizumi T., Shinozaki Y., Ezura H. (2013) Genes that influence yield in tomato. *Breeding Science*, 63: 3-13.
- Arumuganathan K., Earle E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 208-218.
- Ashrafi H., Kinkade M.P., Merk H.L., Foolad. M.R. (2012) Identification of novel quantitative trait loci for increased lycopene content and other fruit quality traits in a tomato recombinant inbred line population. *Molecular Breeding*, 30: 549-567.
- Atarés A., Moyano E., Schleicher P., García-Abellán J.O., Antón T., García-Sogo B., Perez-Martín F., Lozano R., Flores F.B., Moreno V., Bolarín Mdel C., Pineda B (2011) An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*. *Plant Cell Reports*, 30: 1865-1879.
- Azpiroz-Leehan R. and Feldman K.A. (1997) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis* going back and forth. *Trends in Genetics*, 13: 152-156.
- Balbi V. and Lomax T.L. (2003) Regulation of early tomato fruit development by *Diageotropica* gene. *Plant Physiology*, 131: 186–197.
- Ballinger D.G. and Benzer S. (1989) Targeted gene mutations in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86: 9402–9406.
- Bandurski R.S., Cohen J.D., Slovin J.P., Reinecke D.M. (1995) Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies PJ editor. *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 39–65.
- Bar M. and Ori N. (2014) Leaf development and morphogenesis. *Development*, 141: 4219-4230.
- Barrero L.S., Cong B., Wu F., Tanksley S.D. (2006) Developmental characterization of the fasciated locus and mapping of Arabidopsis candidate genes involved in the control of floral meristem size and carpel number in tomato. *Genome*, 49: 991–1006.
- Barrero L.S. and Tanksley S.D. (2004) Evaluating the genetic basis of multiple-locule fruit in a broad cross section of tomato cultivars. *Theoretical Applied Genetics*, 109: 669–679.
- Barry C.S., Aldridge G.M., Herzog G., Ma Q., McQuinn R.P., Hirschberg J., Giovannoni J.J. (2012) Altered chloroplast development and delayed fruit ripening caused by mutations in a zinc metalloprotease at the *lutescent2* locus of tomato. *Plant Physiology*, 159: 1086-1098.
- Bartley G.E. and Ishida B.K. (2003) Developmental gene regulation during tomato fruit ripening and *in-vitro* sepal morfogenesis. *BMC Plant Biology*, 3.
- Bartrina I., Otto E., Strnad M., Werner T., Schmulling T. (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 23: 69–80.
- Bassel G.W., Zielinska E., Mullen R.T., Bewley J.D. (2004) Downregulation of DELLA genes is not essential for germination of tomato, soybean, and *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology*, 136: 2782– 2789.

- 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: 585–593.
- Basu A. and Imrhan V. (2007)** Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: conclusions from clinical trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61: 295–303.
- Bellen H.J. (1999)** Ten years of enhancer detection: Lessons from the fly. *The Plant Cell*, 11: 2271–2281.
- Benfey P.N. and Chua N-H. (1989)** Regulated genes in transgenic plants. *Science*, 244: 174–181.
- Bensen R.J. and Zeevaart J.A.D. (1990)** Comparison of *ent*-kaurene synthase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and *gib-1*, *gib-2*, and *gib-3* tomato plants. *Journal of Plant Growth Regulators*, 9: 237–242.
- Beraldi D., Picarella M.E., Soressi G.P., Mazzucato A. (2004)** Fine mapping of the parthenocarpic fruit (*pat*) mutation in tomato. *Theoretical Applied Genetics*, 108: 209–216.
- Bergervoet J.H.W., Verhoeven H.A., Gilissen L.J.W. Bino R.J. (1996)** High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp. *Plant Science*, 116: 141–145.
- Blumenfeld A. and Gazit S. (1970)** Cytokinin activity in avocado seeds during fruit development. *Plant Physiology*, 46: 331–333.
- Bohner J., Bangerth F. (1988)** Cell number, cell size and hormone levels in semi-isogenic mutants of *Lycopersicon pimpinellifolium* differing in fruit size. *Physiologia Plantarum*, 72: 316–320.
- Bohner J., Hedden P., Borahaber E., Bangerth F. (1988)** Identification and quantitation of gibberellins in fruits of *Lycopersicon esculentum*, and their relationship to fruit size in *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Physiologia Plantarum*, 73: 348–353.
- Bonnema G., Hontelez J., Verkerk R., Zhang Y.Q., van Daelen R., van Kammen A., Zabel P. (1996)** An improved method of partially digesting plant megabase DNA suitable for YAC cloning: application to the construction of a 5.5 genome equivalent YAC library of tomato. *Plant Journal*, 9: 125–133.
- Bovy A.G., Angenent G.C., Dons H.J.M., van Altvorst A.C. (1999)** Heterologous expression of the *Arabidopsis* *etr1-1* allele inhibits the senescence of carnation flowers. *Molecular Breeding*, 5: 301–308.
- Brown D.E., Rashotte A.M., Murphy A.S., Normanly J., Tague B.W., Peer W.A., Taiz L., Muday G.K. (2001)** Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126: 524–535.
- Brukhin V., Hernould M., Gonzalez N., Chevalier C., Mouras A. (2003)** Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. Sweet cherry. *Sexual Plant Reproduction*, 15: 311–320.
- Brunaud V., Balzergue S., Dubreucq B., Aubourg S., Samson F., Chauvin S., Bechtold N., Cruaud C., DeRose R., Pelletier G., Lepiniec L., Caboche M., Lecharny A. (2002)** T-DNA integration into *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Reports*, 3: 1152–1157.
- Buckley M. (30/05/2012)** *Tomato genome becomes fully sequenced – paving the way for healthier fruits and vegetables*. Boyce Thompson Institute and Cornell University Press Office (<http://bti.cornell.edu/index.php?page=NewsDetails&id=135>).
- Budiman M.A., Mao L., Wood T.C., Wing R.A. (2000)** A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Research*, 10: 129–136.

- Bungerkibler S. and Bangerth F. (1983)** Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regulation*, 1: 143–154.
- Busi M.V., Bustamante C., D'Angelo C., Hidalgo–Cuevas M., Boggio S., Valle E.M., Zabaleta E. (2003)** MADS–box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Molecular Biology*, 52: 801–815.
- Butler L. (1936)** Inherited characters in the tomato II – Joint pedicel. *Journal of Heredity*, 27: 25–26.
- Campisi L., Yang Y., Yi Y., Heiling E., Herman B., Cassista A.J., Allen D.W., Xiang H., Jack T. (1999)** Generation el enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence. *Plant Journal*, 17: 699–707.
- Cara B. y Giovannoni J.J. (2008)** Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science*, 175: 106–113.
- Carmi N., Salts Y., Dedicova B., Shabtai S., Barg R. (2003)** Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *roIB* gene in the ovary. *Planta*, 217: 726–735.
- Carrera E., Ruiz-Rivero O., Peres L.E., Atares A., Garcia-Martinez J. L. (2012)** Characterization of the procerca tomato mutant shows novel functions of the SIDEELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. *Plant Physiology*, 160: 1581–1596.
- Carter J.D., Pereira A., Dickerman A.W., Veilleux E.E. (2013)** An active *Ac/Ds* transposon system for activation tagging in tomato cultivar M82 using clonal propagation. *Plant Physiology*, 162: 145–156.
- Casares F., Bender W., Merriam J., Sanchez-Herrero E. (1997)** Interactions of *Drosophila* Ultrabithorax regulatory regions with native and foreign promoters. *Genetics*, 145: 123–137.
- Castle L.A. and Meinke D.W. (1994)** A *FUSCA* gene of *Arabidopsis* encodes a novel protein essential for plant development. *Plant Cell*, 6: 25–41.
- Castle L.A., Errampalli D., Atherton T.L., Franzmann L.H., Yoon E.S., Meink D.W. (1993)** Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics*, 241: 504–514.
- Chakrabarti M., Zhang N., Sauvage C., Muños S., Blanca J., Cañizares J., Diez M.J., Schneider R., Mazourek M., McClead J., Causse M., van der Knaap E. (2013)** A cytochrome P450 CYP78A regulates a domestication trait in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Proceedings of National Academy of Sciences*, 110: 17125–17130.
- Chamarro J. (1995)** Anatomía y fisiología de la planta. En: Nuez F. (ed.) *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundo Prensa, Madrid. pp. 44–91.
- Champagne C. and Sinha N. (2004)** Compound leaves: equal to the sum of their parts? *Development*, 131: 4401–4412.
- Chang H., Jones M.L., Banowitz G.M., Clark D.G. (2003)** Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with PSAG12-*IPT* delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. *Plant Physiology*, 132: 2174–2183.
- Chapman G.P. (1987)** The tapetum. *International Review of Cytology – A Survey of Cell Biology*, 107: 111–125.
- Chatfield S.P., Stirnberg P., Forde B.G., Leyser O. (2000)** The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 24: 159–169.

- Chaudhury A.M., Ming L., Miller C., Craig S., Dennis E.S., Peacock W.J. (1997)** Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 94: 4223–4228.
- Chen G., Bi Y.R., Li N. (2005)** *EGY1* encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development. *Plant Journal*, 41: 364–375.
- Chen S., Jin W., Wang M., Zhang F., Zhou J., Jia Q., Wu Y., Liu F., Wu P. (2003)** Distribution and characterization of over 1000 T-DNA tags in rice genome. *Plant Journal*, 36: 105–113.
- Chiang H.H., Hwang I., Goodman H.M. (1995)** Isolation of the *Arabidopsis GA4* Locus. *Plant Cell*, 7: 195–201.
- Clark S.E., Running M.P., Meyerowitz E.M. (1993)** CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development*, 119: 397–418.
- Cline M.G. (1996)** Exogenous auxin effects on lateral bud outgrowth in decapitated shoots. *Annals of Botany*, 78: 255–266.
- Cline M.G. and Oh C. (2006)** A reappraisal of the role of abscisic acid and its interaction with auxin in apical dominance. *Annals of Botany*, 98: 891–897.
- Cluster P.D., O'Dell M., Metzloff M., Flavell R.B. (1996)** Details of T-DNA structural organization from a transgenic *Petunia* population exhibiting co-suppression. *Plant Molecular Biology*, 32: 1197–1203.
- Cockshull K. and Ho L. (1995)** Regulation of tomato fruit size by plant density and truss thinning. *Journal of Horticultural Science*, 70: 395–407.
- Coen E.S. y Meyerowitz E.M. (1991)** The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31- 37.
- Cohen S.S. (1998)** *A guide to the polyamines*. New York, USA: Oxford University Press.
- Cohen J.D., Slovin J.P., Hendrickson A. (2003)** Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 8: 197-199.
- Comstock J.P. (2002)** Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany*, 53: 195– 200.
- Cong B., Liu J., Tanksley S.D. (2002)** Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 13606-13611.
- Cortina C. y Culiáñez-Macià F. A. (2004)** Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 269-275.
- Curtis M.J., Belcram K., Bollamnn S.R., Tominey C.M., Hoffman P.D., Mercier R., Hays J.B. (2009)** Reciprocal chromosome translocation associated with TDNA-insertion mutation in *Arabidopsis*: genetic and cytological analyses of consequences for gametophyte development and for construction of doubly mutant lines. *Planta*, 229: 731-745.
- Dafni A., Firmage D. (2000)** Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics Evolution*, 222: 113-132.
- Dalla Costa L., Pinto-Sintra A.L., Campa M., Poletti V., Martinelli L., Malnoy M. (2014)** Development of analytical tools for evaluating the effect of T-DNA chimeric integration in transgenic expression in vegetatively propagated plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 118: 471-484.
- David-Schwartz R., Weintraub L., Vidavski R., Zemach H., Murakhovsky L., Swartzberg D., Granot D. (2013)** The *SIFRK4* promoter is active only during late stages of pollen and anther development. *Plant Science*, 199-200: 61-70.

- De Buck S., Jacobs A., Van Montagu M. Depicker A. (1999)** The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant Journal*, 20: 295–304.
- de Jong M., Mariani C., Vriezen W.H. (2009a)** The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1523-1532.
- de Jong M., Wolters-Arts M., Feron R., Mariani C., Vriezen W.H. (2009b)** The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SIARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *Plant Journal*, 57: 160–170.
- de Jong M., Wolters-Arts M., Garcia- Martinez J.L., Mariani C., Vriezen W.H. (2011)** The *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (SIARF7) mediates cross-talk between auxin and gibberellin signalling during tomato fruit set and development. *Journal of Experimental Botany*, 62: 617–626.
- De Martinis D. y Mariani C. (1999)** Silencing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of the ovule development in transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, 11: 1061-1071.
- de Martino G., Pan I., Emmanuel E., Levy A., Irish V.F. (2006)** Functional analyses of two tomato *APETALA3* genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *Plant Cell*, 18: 1833-1845.
- DeNeve M., DeBuck S., Jacobs A., VanMontagu M., Depicker A. (1997)** T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from ligation of separate T-DNAs. *Plant Journal*, 11: 15-29.
- De Storme N., Geelen D. (2013)** Pre-meiotic endomitosis in the cytokinesis-defective tomato mutant *pmcd1* generates tetraploide meiocytes and diploid gametes. *Journal of Experimental Botany*, 64: 2345-2358.
- Devoghalaere F., Doucen T., Guitton B., Keeling J., Payne W., Ling T. J., Ross J.J., Hallett I.C., Gunaseelan K., Dayatilake G.A., Diak R., Breen K.C., Tustin D.S., Costes E., Chagné D., Schaffer R.J., David K.M. (2012)** A genomics approach to understanding the role of auxin in apple (*Malus × domestica*) fruit size control. *BMC Plant Biology*, 12: 7.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. (2005)** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435: 441–445.
- Dielen V., Marc D., Kinet J.M. (1998)** Flowering in the *uniflora* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): description of the reproductive structure and manipulation of flowering time. *Plant Growth Regulation*, 25: 149–157.
- Dielen V., Quinet M., Chao J., Batoko H., Havelange A., Kinet J. M. (2003)** *UNIFLORA*, a pivotal gene that regulates floral transition and meristem identity in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *New Phytologist*, 161: 393–400.
- Dill A. and Sun T. (2001)** Synergistic Derepression of Gibberellin Signaling by Removing RGA and GAI Function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 159: 777–785.
- Domínguez E., Cuartero J., Fernández-Muñoz R. (2005)** Breeding tomato for pollen tolerance to low temperatures by gametophytic selection. *Euphytica*, 142: 253-263.
- Dong Y. and von Arnim A.G. (2003)** Novel plant activation-tagging vectors designed to minimize 35S enhancer-mediated gene silencing. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21: 349-358.
- Dorcey E., Urbez C., Blázquez M.A., Carbonell J., Perez-Amador M.A. (2009)** Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in Arabidopsis. *Plant Journal*, 58: 318–332.
- Drews G.N. y Yadegari R. (2002)** Development and function of the Angiosperm female gametophyte. *Annual Review of Genetics*, 36: 99-124.

- Dumas C., Berger F., Faure J. E., Matthys-Rochon E. (1998)** Gametes, fertilization and early embryogenesis in flowering plants. *Advances in Botanical Research*, 28: 231–261.
- Dun E.A., Ferguson B.J., Beveridge C.A. (2006)** Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiology*, 142: 812–819.
- Duvick D.N. (1999)** Heterosis: feeding people and protecting natural resources. En: Coors J.G., Pandey S. (eds.) *Genetics and Exploitation of heterosis in Crops*. pp. 19–29.
- Echlin P. (1971)** Production of sporopollenin by the tapetum. En: Brooks J., Grant P.R., Muir M., van Gijzel P., Shaw G. (eds.) *Sporopollenin*. Ediciones Academic Press, London. pp. 220–247.
- Egli D.B. (2010)** SOYPOD: A model of fruit set in soybean. *Agronomy Journal*, 102: 39–47.
- Estruch J.J., Prinsen E., Van Onckelen H., Schell J., Spina A. (1991)** Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin-synthesizing gene. *Science*, 254: 1364–1367.
- Farabee, M.J. (2001)** Flowering Plant Reproduction: Fertilization and Fruits. The Online Biology Book. Estrella Mountain Community College, Arizona.
- Farrar K., Evans M., Topping J.F., Souter M.A., Nielsen J., Lindsey K. (2003)** *EXORDIUM*—a gene expressed in proliferating cells and with a role in meristem function, identified by promoter trapping in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 33: 61–73.
- Favaro R., Pinyopich A., Battaglia R., Kooiker M., Borghi L., Ditta G., Yanofsky M. F., Kater M.M., Colombo L. (2003)** MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 2603–2611.
- Fedoroff N.V. and Smith D.L. (1993)** A versatile system for detecting transposition in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 3: 273–289.
- Feldmann K.A. (1991)** T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant Journal*, 1: 71–82.
- Feldmann K.A., Marks M.D., Christianson A., Quatrano R. S. (1989)** A Dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science*, 243 1351–1354.
- Fernández-Lozano A., Yuste-Lisbona F.J., Pérez-Martín F., Pineda B., Moreno V., Lozano R., Angosto T. (2015)** Mutation at the tomato *EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO)* locus impairs floral meristem development, thus promoting an increased number of floral organs and fruit size. *Plant Science*, 232: 41–48.
- Ferrario S., Immink R.G.H., Shchennikova A., Busscher-Lange J., Angenot G.C. (2003)** The MADS box gene *FBP2* is required for *SEPALLATA* function in petunia. *Plant Cell*, 15: 914–925.
- Ficcadenti N., Sestili S., Pandolfini T., Cirillo C., Rotino G. L., Spina A. (1999)** Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Molecular Breeding*, 5: 463–470.
- Finkelstein R., Reeves W., Ariizumi T., Steber C. (2008)** Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 387–415.
- Firon N., Nepi M., Pacini E. (2012)** Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. *Annals of Botany*, 109: 1201–1213.
- Fleishon S., Shani E., Ori N., Weiss D. (2011)** Negative reciprocal interactions between gibberellin and cytokinin in tomato. *New Phytologist*, 190: 609–617.
- Fobert P.R., Labbé H., Cosmopoulos J., Gottlob-McHugh S., Ouellet T., Hattori J., Sunohara G., Iyer V.N., Miki B. L. (1994)** T-DNA tagging of a seed coat-specific cryptic promoter in tobacco. *Plant Journal*, 6: 567–577.

- Foolad M. R. (2007)** Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 2007: 1–52.
- Fos M. and Nuez F. (1996)** Molecular expression of genes involved in parthenocarpic fruit set in tomato. *Physiologia Plantarum*, 98: 165-171.
- Fos M., Nuez F., García-Martínez J.L. (2000)** The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiology*, 122: 471-479.
- Fos M., Proano K., Nuez F., García-Martínez J.L. (2001)** Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiologia Plantarum*, 111: 545–550.
- Franzman L.H., Yoon E.S., Meinke D.W. (1995)** Saturating the genetic map of *Arabidopsis thaliana* with embryonic mutations. *Plant Journal*, 7: 341-350.
- Frary A., Nesbitt T. C., Grandillo S., van der Knaap E., Cong B., Liu J., Meller J., Elber R., Alpert K.B., Tanksley S.D. (2000)** fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, 289: 85–88.
- Frodin D.G. (2004)** History and concepts of big plant genera. *Taxon*, 53(3): 753-776.
- Frugis G, Giannino D, Mele G, Nicolodi C, Innocenti AM, Chiappetta A, Bitonti MB, Dewitte W, Van Onckelen H, Mariotti D. (1999)** Are homeobox *Knotted*-like genes and cytokinins the leaf architects? *Plant Physiology*, 119: 1-3.
- Fu X., Duc L.T., Fontana S., Bong B.B., Tinjuangjun P., Sudhakar D., Twyman R. M., Christou P., Kohli A. (2000)** Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plant with simple integration patterns. *Transgenic Research*, 9: 11–19.
- Fuentes S. y Vivian-Smith A. (2009)** Fertilization and fruit initiation, in *Fruit Development and Seed Dispersal*, ed. L. Østergaard, Vol. 38 (Oxford: Wiley Blackwell Publishing), 107–171.
- Gan S. and Amasino R.M. (1995)** Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270: 1986–1988.
- García-Hernández M., Berardini T.Z., Chen G., Crist D., Doyle A., Huala E., Knee E., Lambrecht M., Miller N., Mueller L.A., Mundodi S., Reiser L., Rhee S.Y., Scholl R., Tacklind J., Weems D.C., Wu Y., Xu I., Yoo D., Yoon J., Zhang P. (2002)** TAIR: a resource for integrated *Arabidopsis* data. *Functional and Integrative Genomics*, 2: 239-253.
- García-Martínez J.L., López-Díaz I., Sánchez-Beltrán M.J., Phillips A.L., Ward D.A., Gaskin P., Hedden P. (1997)** Isolation and transcript analysis of gibberellin 20-oxidase genes in pea and bean in relation to fruit development. *Plant Molecular Biology*, 33: 1073-1084.
- García-Martínez J.L., Martí M., Sabater T., Maldonado A., Vercher Y. (1991)** Development of fertilized ovules and their role in the growth of the pea pod. *Physiologia Plantarum*, 83: 411-416.
- Gasser Ch.S., Winter J.A., Hironaka C.M., Shah D.M. (1988)** Structure, expression, and evolution of the 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes of *Petunia* and *Tomato*. *Journal of Biological Chemistry*. 263: 4280–4289.
- George W., Scott J., Spiltstoesser W. (1984)** Parthenocarpy in tomato. *Horticultural Reviews*, 6: 65-84.
- Geuns J.M., Smets R., Struyf T., Prinsen E., Valcke R., Van Onckelen H. (2001)** Apical dominance in Pssu-ipt-transformed tobacco. *Phytochemistry*, 58: 911–921.
- Gidoni D., Fuss E., Burbidge A., Speckmann G-J., James S., Nijkamp D. Mett A. Feiler J, Smoker M., Vroomen M.J, Leader D. Liharska T., Groenendijk J., Coppoolse E., Smit J.J.M., Levin**

- I., Both M., Schuch W., Jones J.D.G., Taylor I.B., Theres K., Haaren M.J.J. (2003) Multi-functional T-DNA/Ds tomato lines designed for gene cloning and molecular and physical dissection of the tomato genome. *Plant Molecular Biology*, 51: 83–98.
- Gillaspy G., Ben-David H., Gruissem W. (1993) Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell*, 5: 1439-1451.
- Gilliland L.U., Pawloski L.C., Kandasamy M.K., Meagher R.B. (2003) *Arabidopsis* actin gene *ACT7* plays an essential role in germination and root growth. *Plant Journal*, 33: 319–328.
- Giménez E., Pineda B., Capel J., Antón M.T., Atarés A., Pérez-Martín F., García-Sogo B., Angosto T., Moreno V., Lozano R. (2010) Functional analysis of the *Arlequin* mutant corroborates the essential role of the *ARLEQUIN/TAGL1* gene during reproductive development of tomato. *Plos One*, 5: e14427.
- Giovannoni J.J. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 16: S170-S180.
- Goetz M., Vivian-Smith A., Johnson S.D., Koltunow A.M. (2006) *AUXIN RESPONSE FACTOR8* is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18: 1873–1886.
- Goetz M., Hooper L.C., Johnson S.D., Rodrigues J.C.M., Vivian-Smith A., Koltunow A.M. (2007) Expression of aberrant forms of *AUXIN RESPONSE FACTOR8* stimulates parthenocarp in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiology*, 145: 351–366.
- Goldsbrough A.P., Tong Y., Yoder J.I. (1996) *Lc* as a non-destructive visual reporter and transposition excision marker gene for tomato. *Plant Journal*, 9: 927–933.
- Gómez P., Jamilena M., Capel J., Zurita S., Angosto T., Lozano R. (1999) *Stamenless*, a tomato mutant with homeotic conversions in petals and stamens. *Planta*, 209: 172–179.
- Gonzalo M.J. and van der Knaap E. (2008) A comparative analysis into the genetic bases of morphology in tomato varieties exhibiting elongated fruit shape, *Theoretical Applied Genetics*, 116: 647–656.
- Gorguet B., Eggink P.M., Ocana J., Tiwari A., Schipper D., Finkers R., Visser R.G., van Heusden A.W. (2008) Mapping and characterization of novel parthenocarp QTLs in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 755–767.
- Gorguet B., Schipper D., van Lammeren A., Visser R.G.F., van Heusden A., W. (2009) *ps-2*, the gene responsible for functional sterility in tomato, due to non-dehiscent anthers, is the result of a mutation in a novel polygalacturonase gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 1199-1209.
- Gorguet B., van Heusden A.W., Lindhout P. (2005) Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biology*, 7: 131–139.
- Gould W.A. (1983) *Tomato production, processing and Quality Evaluation*. 2nd Edition. AVI Publishing Company, Inc. Westport, CT. pp. 3-50.
- Grandillo S., Ku H.M., Tanksley S.D. (1996) Characterization of *fs8.1*, a major QTL influencing fruit shape in tomato. *Molecular Breeding*, 2: 251–260.
- Gray W.M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O., Estelle M. (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, 414: 271–276.
- Groover A., Fontana J. R., Dupper G., Ma C., Martienssen R., Strauss S., Meilan R. (2004) Gene and enhancer trap tagging of vascular-expressed genes in poplar trees. *Plant Physiology*, 134: 1742–1751.
- Grossniklaus U., Bellen H.J., Wilsn C., Gehring W.J. (1989) P-element-mediated enhancer detection applied to the study of oogenesis in *Drosophila*. *Development*, 107: 189-200.

- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F., Martienssen, R. (1998)** The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*, 125: 1509–1517.
- Guilfoyle T.J. and Hagen G. (2007)** Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 453–460.
- Guo Y. and Gan S. (2006)** *AtNAP*, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *Plant Journal*, 46: 601–612.
- Guo M., Rupe M.A., Dieter J.A., Zou J., Spielbauer D., Duncan K.E., Howard R.J., Hou Z., Simmons C.R. (2010)** Cell Number Regulator1 affects plant and organ size in maize: implications for crop yield enhancement and heterosis. *Plant Cell*, 22: 1057–1073.
- Gustafson F.G. (1960)** Influence of gibberellic acid on setting and development of fruits in tomato. *Plant Physiology*, 35: 521–523.
- Hackbusch J., Richter K., Muller J., Salamini F., Uhrig J.F. (2005)** A central role of *Arabidopsis thaliana* ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 102: 4908–4912.
- Hajouj T., Michelis R., Gepstein Sh. (2000)** Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiology*, 124: 1305–1314.
- Hake S., Smith H.M.S., Holtan H., Magnani E., Mele G., Ramirez J. (2004)** The role of *KNOX* genes in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20: 125–151.
- Hamamura Y., Nagahara S., Higashiyama T. (2012)** Double fertilization on the move. *Current Opinion in Plant Biology*, 15: 70–77.
- Hamilton A.J. and Baulcombe D.C. (1999)** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286: 950–952.
- Hänsch R., Koprek T., Mendel R.R., Schulze J. (1995)** An improved protocol for eliminating endogenous β -glucuronidase background in barley. *Plant Science*, 90: 63–69.
- Harberd N.P., Belfield E., Yasumura Y. (2009)** The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell*, 21: 1328–1339.
- Harlan J.R. (1971)** Agricultural origins: centers and noncenters. *Science*, 174: 468–474.
- Harrison E.J., Bush M., Plett J.M., McPhee D.P., Vitez R. O, Malley B., Sharma V., Bosnich W., Seguin A., MacKay J. (2007)** Diverse developmental mutants revealed in an activation-tagged population of poplar *Canadian Journal of Botany*, 85: 1071–1081.
- Haseloff J., Siemerling K.R., Prasher D.C., Hodge S. (1997)** Removal of cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 2122–2127.
- Hay A., Craft J., Tsiantis M. (2004)**. Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap?. *Bioessays*, 26: 395–404.
- Hay A., Kaur H., Phillips A.S., Hedden P., Hake S., Tsiantis M. (2002)** The gibberellin pathway mediates knotted1-type homeobox function in plants with different body plans. *Current Biology*, 12: 1557–1565.
- Hayashi H., Czaja I., Lubenow H., Schell J., Walden R. (1992)** Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth *in vitro*. *Science*. 258: 1350–1353.

- Hazra P., Dutta A.K., Chatterjee P. (2010)** Altered gibberellin and auxin levels in the ovaries in the manifestation of genetic parthenocarpy in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Current Science*, 99: 1439-1443.
- He Y., Tang W., Swaim J.D., Green A.L., Jack T.P., Gan S. (2001)** Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiology*, 126: 707-716.
- Hedden P. y Phillips A.L. (2000)** Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*, 5: 523-530.
- Herde O., Peña-Cortés H., Wasternack C., Willmitzer L., Fisahn J. (1999)** Electric signaling and *Pin2* gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold level of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiology*, 119: 213-218.
- Herman L., Jacobs A., Montagu M.V., Depicker A. (1990)** Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integrations events. *Molecular and General Genetics*, 224: 248-256.
- Heuvelink E. (1996)** *Tomato Growth and Yield: Quantitative Analysis and Synthesis*. Ph.D. thesis, Wageningen University, Wageningen.
- Heuvelink E. (1997)** Effect of fruit load on dry matter partitioning in tomato. *Scientia Horticulturae*, 69: 51-59.
- Hewelt A., Prinsen E., Thomas M., Van Onckelen H., Meins F.Jr. (2000)** Ectopic expression of maize *knotted1* results in the cytokinin-autotrophic growth of cultured tobacco tissues. *Planta*, 210: 884-889.
- Hirochika H., Guiderdoni E., An G., Hsing Y., Eun M. Y., Han Ch-d., Upadhyaya N., Ramachandran S., Zhang Q., Pereira A., Sundaresan V., Leung H. (2004)** Rice mutant resource from gene discovery. *Plant Molecular Biology*, 54: 325-334.
- Ho L.C. (1996)** Tomato. En: Zamki E. and Shaffer A.A. (eds.) *Photoassimilate distribution in plants and crops*. Marcel Dekker, New York, USA. pp. 709-772.
- Ho L. and Hewitt J. (1986)** Fruit development. In *The Tomato Crop* (Ather-ton, J. and Rudich, J., eds). New York: Champman and Hall, pp. 201-239.
- Hodal L., Bocharadt A., Nielsen J.E., Mattsson O., Okkels F.T. (1992)** Detection, expression and specific elimination of endogenous β -glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic plants. *Plant Science*, 87: 115-122.
- Honys D., Twell D. (2003)** Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome. *Plant Physiology*, 132: 640-652.
- Howden R., Park S.K., Moore J.M., Orme J., Grossniklaus U., Twell D. (1998)** Selection of T-DNA-tagged male and female gametophytic mutants by segregation distortion in *Arabidopsis*. *Genetics*, 149: 621-631.
- Howlett F.S. (1939)** The modification of flower structure by environment in varieties of *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Agricultural Resources*, 58: 79-117.
- Hu C.-Y., Chee P.P., Chesney R.H., Zhou J.H., Miller P.D., O'Brien W.T. (1990)** Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Reports*, 9: 1-5.
- Huang L.Ch., Lai U.L., Yang S.F., Chu M.J., Kuo Ch.I., Tsai M.F., Sun Ch.W. (2007)** Delayed flower senescence of *Petunia hybrida* plants transformed with antisense broccoli *ACC synthase* and *ACC oxidase* genes. *Postharvest Biology and Technology*, 46: 47-53.

- Huang S., Cerny R.E., Qi Y.L., Bhat D., Aydt C.M., Hanson D.D., Malloy K.P., Ness L.A. (2003) Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. *Plant Physiology*, 131: 1270–1282.
- Hueros G. y Jouve N. (2002) Genómica funcional en plantas. En: Genómica y Mejora Vegetal. Junta de Andalucía, Ediciones Mundi Prensa D.L. (Sevilla, España). pp 331 – 364.
- Imanishi S. y Nagata M. (2004) The effect of methyl jasmonate on the expression of ripening related genes in tomato fruits. *Plant and Cell Physiology*, 45: S78-S78.
- Ingrosso I., Bonsegna S., Dedomenico S., Laddomada B., Blando F., Santino A. Giovinazzo G. (2011) Over-expression of a grape stilbene synthase gene in tomato induces parthenocarp and causes abnormal pollen development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1092–1099.
- Irish V.F. (2003) The evolution of floral homeotic gene function. *Bioessays*, 25: 637-646.
- Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda K., Nishida I., Okada K. (2001) The DEFECTIVE IN ANTHOR DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell*: 13, 2191-2209.
- Iwai H., Terao A., Satoh S. (2013) Changes in distribution of cell wall polysaccharides in floral and fruit abscission zones during fruit development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Plant Research*, 126: 427-437.
- Jack T. (2004) Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell*, 16(S): S1-S17.
- Jacobsen S.E. y Olszewski N.E. (1991) Characterization of the arrest in anther development associated with gibberellin deficiency of the *gib-1* mutant of tomato. *Plant Physiology*, 97: 409-414.
- Jatoi A., Burch P., Hillman D., Vanyo J.M., Dakhil S., Nikcevic D., Rowland K., Morton R., Flynn P.J., Young C., Tan W. (2007) A tomato-based, lycopene-containing intervention for androgen-independent prostate cancer: results of a phase II study from the north central cancer treatment group. *Urology*, 69: 289-294.
- Jefferson R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5: 387-405.
- Jefferson R.A., Burgess S.M., Hirsh D. (1986) β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 8447-8451.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987) Beta-glucuronidase (GUS) as a sensitive and versatile gene fusion marker in plants. *Journal of Cellular Biochemistry*, 11B: 57-57.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6: 3901-3907.
- Jeon J.S., Lee S., Jung K.H., Jun S.H., Jeong D.H., Lee J., Kim Ch., Jang S., Lee Sh., Yang K., Nam J., An K., Han M.-J., Sung R.J., Choi H. S., Yu J.H., Choi J.H., Cho S.Y., Cha S.S., Kim Shl., An G. 2000. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant Journal*, 22: 561- 570.
- Jeong D.H. , An S., Kang H.G., Moon S., Han J.J., Park S., Lee H.S., An K., An G. (2002) T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiology*, 130: 1–9.
- Jeong D.H., An. S., Park S., Kang H.G., Park G.G., Kim S.R., Sim J., Kim Y.O., Kim M.K., Kim S.R., Kim J., Shin M., Jung M., An G. (2006) Generation of a flanking sequence-tag database for activation-tagging lines in japonica rice. *The Plant Journal*, 45: 123-132.
- Jiang N., Gao D., Xiao H., van der Knaap E. (2009) Genome organization of the tomato sun locus and characterization of the unusual retrotransposon Rider. *Plant Journal*, 60: 181–193.

- Jing H.Ch., Sturre M.J.G., Hille J., Dijkwel P.P. (2002) *Arabidopsis* onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *Plant Journal*, 32: 51–63.
- Jofuku K.D., Boer B.G.V., Van Montagu M., Okamoto J.K. (1994) Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *The Plant Cell*, 6: 1211-1225.
- John I., Drake R., Farrell A., Cooper W., Lee P., Horton P., Grierson D. (1995) Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *Plant Journal*, 7: 483–490.
- Jones M.G. (1987) Gibberellins and the *procera* mutant of tomato. *Planta*, 172: 280–284.
- Joubès J., Chevalier C., Dudits D., Heberle-Bors E., Inzé D., Umeda M., Renaudin J.-P. (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Molecular Biology*, 43: 607-620.
- Jupe S.C., Causton D.R., Scott I.M. (1988) Cellular basis of the effects of gibberellin and the *pro* gene on stem growth in tomato. *Planta*, 174: 106–111.
- Kaiser K. and Goodwin S.F. (1990) "Site-selected" transposon mutagenesis of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 1686–1690.
- Kania A., Salzberg A., Bhat M., D'Evelyn D., He Y., Kiss I., Bellen H.J. (1995). P-element mutations affecting embryonic peripheral nervous system development in *Drosophila melano-gaster*. *Genetics*, 139: 1663–1678.
- Kataoka K., Uemachi A., Yazawa S. (2003) Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in *pat-2* and auxin-induced parthenocarpic tomato fruits. *Scientia Horticulturae*, 98: 9-16.
- Kato K., Ohta K., Somata Y., Araki T., Kanahama K., Kanayama Y. (2005) Morphological and molecular analyses of the tomato floral mutant *leafy inflorescence*, a new allele of *falsiflora*. *Plant Science*, 169: 131–138.
- Kelly M.O., Bradford K.J. (1986) Insensitivity of the diageotropic tomato mutant to auxin. *Plant Physiology*, 82: 713–717.
- Kerr E.A. (1956) *lutescent 2*, l2. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, 6: 17.
- Kerr E.A. (1982) *SINGLE FLOWER TRUSS 'SFT'* appears to be on chromosome 3. *Tomato Genetics Cooperative Reports*, 32: 31.
- Kepinski S. and Leyser O. (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435: 446–451.
- Kertbundit S., De Greve H., Deboeck F., Van Montagu M., Hernalsteens J.-P. (1991) *In-vivo* random b-glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88: 5212–5216.
- Kinet J.M. y Peet M.M. (1997) Tomato. En: Wien H.C. (ed.) *The Physiology of Vegetable Crops*. Wallingford, UK: Commonwealth Agricultural Bureau (CAB) International. pp. 207–258.
- King R.A. and Van Staden J. (1988) Differential responses of buds along the shoot of *Pisum sativum* to isopentyladenine and zeatin application. *Plant Physiology and Biochemistry*, 26: 253–259.
- Kirik V., Simon M., Huelskamp M., Schiefelbein J. (2004) The *ENHANCER OF TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRYPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Developmental Biology*, 268: 506–513.
- Klee H. y Giovannoni D. (2011) Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review of Genetics*, 45: 41-49.
- Klee H. y Tieman D. (2002) The tomato ethylene receptor gene family. *Physiologia Plantarum*, 115: 336–341.

- Klimyuk V.I., Nussaume L., Harrison K., Jones J.D.G. (1995) Novel GUS expression patterns following transposition of enhancer trap *Ds* element in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics*, 249: 357–365.
- Klug W.S., Cummings M.R., Spencer C.A. (2006) Disección de la función génica: análisis mutacional en organismos modelo. En: *Conceptos de Genética*. Ediciones Prentice Hall (Pearson Education), Madrid. pp 604-641.
- Kobayashi Y. y Weigel D. (2007) Move on up, it's time for change - mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes & Development*, 21: 2371-2384.
- Kolesnik T., Szevenyi I., Bachmann D., Kumar C.S., Jiang S., Ramamoorthy R., Cai M., Ma Z.G., Sundaresan V., Ramachandran S. (2004) Establishing an efficient *Ac/Ds* tagging system in rice: large-scale analysis of *Ds* flanking sequences. *Plant Journal*, 37: 301–314.
- Komari T. (1990) Genetic characterization of a double-flowered tobacco plants obtained in a transformation experiment. *Theoretical and Applied Genetics*, 80: 167–171.
- Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Körber H., Redei G.P., Schell J. (1989) High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86: 8467–8471.
- Kononov M.E., Bassuner B., Gelvin S.B. (1997) Integration of T-DNA binary vector “Backbone” sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant Journal*, 11: 945–957.
- Kosugi S., Ohashi Y., Nakajima K., Arai Y. (1990) An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Science*, 70: 133-140.
- Krieger U., Lippman Z.B., Zamir D. (2010) The flowering gene *SINGLE FLOWER TRUSS* drives heterosis for yield in tomato. *Nature Genetics*, 42: 459-U138.
- Krysan P.J., Young J.C., Sussman M.R. (1999) T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 11: 2283–2290.
- Kucuk O., Sarkar F.H., Sakr W., Khachik F., Djuric Z., Banerjee M., Pollak M.N. Bertram J.S., Wood D.P. Jr. (2002) Lycopene in the treatment of prostate cancer. *Pure and Applied Chemistry*, 74: 1443-1450.
- Kusaba S., Kano-Murakami Y., Matsuoka M., Tamaoki M., Sakamoto T., Yamaguchi I., Fukumoto M. (1998) Alteration of hormone levels in transgenic tobacco plants overexpressing a rice homeobox gene *OSH1*. *Plant Physiology*, 116: 471–476.
- Lang A., Chailakhyan M.Kh., Frolova I.A. 1977. Promotion and inhibition of flower formation in a dayneutral plant in grafts with a short-day plant and a long-day plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74: 2412-2416.
- Larson R.E. y Paur S. (1948) The description and inheritance of a functionally sterile flower mutant in tomato and its probable value in hybrid tomato seed production. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 52: 355-364.
- Lashbrook C.C., Tieman D.M., Klee H.J. (1998) Differential regulation of the tomato *ETR* gene family throughout plant development. *Plant Journal*, 15: 243–252.
- Laufs P., Autran D., Traas J.,A. (1999) Chromosomal paracentric inversion associated with T-DNA integration in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 18: 131–139.
- Leclercq J., Adams-Phillips L., Zegzouti H., Jones B., Latché A., Giovannoni J.J., Pech J.C., Bouzayen M. (2002) *LeCTR1*, a tomato *CTR1*-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in *Arabidopsis* and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiology*, 130: 1132–1142.

- Lee C.Y., Agrawal D.C., Wang C.S., Yu S.M., Chen J.J., Tsay H.S. (2008) T-DNA activation tagging as a tool to isolate *Salvia miltiorrhiza* transgenic lines for higher yields of tanshinones. *Plant Medicine*, 74: 780–786.
- Lee J.M., Joung J.G., McQuinn R., Chung M.Y., Fei Z., Tieman D., Klee H., Giovannoni J. (2012) Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor *SIERF6* plays an important role in ripening and carotenoid accumulation. *Plant Journal*, 70: 191-204.
- Lee M. and Phillips R.L. (1988) Chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 413–437.
- Lee M.K., Kim H.S., Kim J.S., Kim S.H., Park Y.D. (2004) *Agrobacterium* mediated transformation system for large-scale production of transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp *pekinensis*) plants for insertional mutagenesis. *Journal of Plant Biology*, 47: 300–306.
- Lee S.C., Cheng H., King K.E., Wang W., HeY., Hussain A., Lo J., Harberd N.P., Peng J.R. (2002) Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA-like* gene whose expression is upregulated following imbibition. *Genes and Development*, 16: 646–658.
- Leide J., Hildebrandt U., Vogg G., Riederer M. (2011) The *positional sterile* (*ps*) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. *Journal of Plant Physiology*, 168: 871-877.
- Lemaire-Chamley M., Petit J., García V., Just D., Baldet P., Germain V., Fagard M., Cheniclet C., Rothan C. (2005) Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiology*, 139: 750-769.
- Li N., Parsons B.L., Liu D.R., Mattoo A.K. (1992) Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. *Plant Molecular Biology*, 18: 477-487.
- Li T., Heuvelink E., Marcelis L.F.M. (2015) Quantifying the source-sink balance and carbohydrate content in three tomato cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 6: 416.
- Li Y., Rosso M.G., Strizhov N., Viehoveer P., Weisshaar B. (2003) GABI-Kat SimpleSearch: a flanking sequence tag (FST) database for the identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics*, 19: 1441-1442.
- Li X., Gan R., Li P.L., Ma Y.Y., Zhang L.W., Zhang R., Wang Y., Wang N.N. (2006) Identification and functional characterization of a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene that is involved in regulation of soybean leaf senescence. *Plant Molecular Biology*, 61: 829–844.
- Lifschitz E., Brodai L., Hareven D., Hurwitz C., Prihadash A., Pnueli L., Samach A., Zamir D. (1993) Molecular mapping of flower development in tomato. En: *Molecular Biology of tomato*. Ed. Yoder, J. Technomic. Lancaster PA, USA, 175-184.
- Lifschitz E., Eviatar T., Rozman A., Shalit A., Goldshmidt A., Amsellem Z., Alvarez J.P., Eshed Y. (2006) The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 6398–6403.
- Liljegen S.J., Ditta G.S., Eshed Y., Savidge B., Bowman J.L., Yanofsky M.F. (2000) *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*, 404: 766–770.
- Lin T., Zhu G., Zhang J., Xu X., Yu Q., Zheng Z., Zhang Z., Lun Y., Li S., Wang X., Huang Z., Li J., Zhang C., Wang T., Zhang Y., Wang A., Zang Y., Lin K., Li C., Xiong G., Xue Y., Mazzucato A., Causse M., Fei Z., Giovannoni J.J. (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics*, 46: 1220-1226.
- Lin Z., Arciga-Reyes L., Zhong S., Alexander L., Hackett R., Wilson I., Grierson D. (2008) SITPR1,

- a tomato tetratricopeptide repeat protein, interacts with the ethylene receptors NR and LeETR1, modulating ethylene and auxin responses and development. *Journal of Experimental Botany*, 59: 4271–4287.
- Lindsay D.L., Sawhney V.K., Bonham-Smith, P.C. (2006)** Cytokinin-induced changes in *CLAVATA1* and *WUSCHEL* expression temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 170: 1111–1117.
- Lindsey K., Wei, W., Clarke M.C., McArdle H.F., Rooke L.M., Topping J.F. (1993)** Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants. *Transgenic Research*, 2: 33–47.
- Ling H.-Q., Kriseleit D., Ganai M. W. (1998)** Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Reports*, 17: 843-847.
- Linnaeus C. (1753)** *Species Planatarium*. Holmiae. 1st edition. Stockholm, Sweden.
- Lippman Z., and 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: 413–422.
- Liu D.D., Dong Q.L., Fang M.J., Chen K.Q., Hao Y.J. (2012)** Ectopic expression of an apple apomixis-related gene MhFIE induces co-suppression and results in abnormal vegetative and reproductive development in tomato. *Plant Physiology*, 169: 1866-1873.
- Liu J., Van Eck J., Cong B., Tanksley S.D. (2002)** A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 13302–13306.
- Lozano R., Angosto T., Gómez P., Payán C., Capel J., Huijser P., Salinas J., Martínez-Zapater J.M. (1998)** Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of MADS-Box genes. *Plant Physiology*, 117: 91–100.
- Lozano R., Giménez E., Cara B., Capel J., Angosto T. (2009)** Genetic analysis of reproductive development in tomato. *International Journal of Developmental Biology*, 53: 1635-1648.
- Luo K., Deng W., Xiao Y., Zheng X., Li Y., Pei Y. (2006)** Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize knotted1 gene under the control of a wound-inducible promoter. *Plant Cell Report*, 25: 1246–1254.
- Ma H. (2005)** Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 393–434.
- Malayer J.C. y Guard A.T. (1964)** A comparative developmental study of the mutant *sideshootless* and normal tomato plants. *American Journal of Botany*, 51: 140–143.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982)** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mao L., Begum D., Chuang H.W., Budiman M.A., Szymkowiak E.J., Irish E.E., Wing R.A. (2000)** *JOINTLESS* is a MADS-box gene in tomato controlling flower abscission zone development. *Nature*, 406: 910–913.
- Mapelli S., Frova C., Torti G., Soressi G.P. (1978)** Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiology*, 19: 1281-1288.
- Marcelis L.F.M. (1993)** Effect of assimilate supply on the growth of individual cucumber fruits. *Physiologia Plantarum*, 87: 313-320.
- Marcelis L.F.M., Baan Hofman-Eijer L.R. (1993)** Effect of temperature on the growth of individual cucumber fruits. *Physiologia Plantarum*, 87: 321-328.

- Mariotti L., Picciarelli P., Lombardi L., Ceccarelli N. (2011)** Fruit-set and early fruit growth in tomato are associated with increases in indoleacetic acid, cytokinin, and bioactive gibberellin contents. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30: 405–415.
- Marsch-Martinez N., Ramos-Cruz D., Irepan Reyes-Olalde J., Lozano-Sotomayor P., Zuniga-Mayo V.M., de Folter S. (2012)** The role of cytokinin during *Arabidopsis* gynoeceia and fruit morphogenesis and patterning. *Plant Journal*, 72: 222–234.
- Martí C., Orzáez D., Ellul P., Moreno V., Carbonell J., Granell T. (2007)** Silencing of *DELLA* induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant Journal*, 52: 865–876.
- Martinelli F., Uratsu S.L., Reagan R.L. Chen Y., Tricoli D., Fiehn O., Rocke D.M., Gasser C.S., Dandekar A.M. (2009)** Gene regulation in parthenocarpic tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 60: 3873–3890.
- Martínez C., Manzano S., Megías Z., Garrido D., Picó B., JAMILENA M. (2013)** Involvement of ethylene biosynthesis and signalling in fruit set and early fruit development in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *BMC Plant Biology*, 13: 139.
- Mathews H., Clendennen S.K., Caldwell C.G., Liu X.L., Connors K., Matheis N., Schuster D.K., Menasco D.J., Wagoner W., Lightner J., Wagner D.R. (2003)** Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell*, 15: 1689–1703.
- Matsuda R., Suzuki K., Nakano A., Higashide T., Takaichi M. (2011)** Responses of leaf photosynthesis and plant growth to altered source–sink balance in a Japanese and a Dutch tomato cultivar. *Scientia Horticulturae*, 127: 520–527.
- Matsuo S., Kikuchi K., Fukuda M., Honda I., Imanishi S. (2012)** Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 63, 5569–5579.
- Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Bakkeren G., Cramer A., Angelis K., Redei G.P., Schnell J., Hohn B., Koncz C. (1991)** T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO Journal*, 10: 697–704.
- Mazzucato A., Cellini F., Bouzayen M., Zouine M., Mila I., Minoia S., Petrozza A., Picarella M.E., Ruiu F., Carriero F. (2015)** A TILLING allele of the tomato *Aux/IAA9* gene offers new insights into fruit set mechanisms and perspectives for breeding seedless tomatoes. *Molecular Breeding*, 35: 22.
- Mazzucato, A., Olimpieri I., Siligato F., Picarella M.E., Soressi G.P. (2008)** Characterization of genes controlling stamen identity and development in a parthenocarpic tomato mutant indicates a role for the *DEFICIENS* ortholog in the control of fruit set. *Physiologia Plantarum*, 132: 526–537.
- Mazzucato A., Taddei A.R., Soressi G.P. (1998)** The *parthenocarpic fruit (pat)* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development*, 125: 107–114.
- McCabe M.S., Garratt L.C., Schepers F., Jordi W.J.R.M., Stoopen G.M., Davelaar E., van Rhijn J.H.A., Power J.B., Davey M.R. (2001)** Effects of PSAG12-*IPT* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiology*, 127: 505–516.
- McCall K., O'Connor M.B., Bender W. (1994)** Enhancer traps in the *Drosophila* bithorax complex mark parasegmental domains. *Genetics*, 138: 387–399.
- McCormick S. (2004)** Control of male gametophyte development. *Plant Cell*, 16: S142-S153.
- McNeil K.J. y Smith A.G. (2005)** An anther-specific cysteine-rich protein of tomato localized to the tapetum and microspores. *Journal of Plant Physiology*, 162: 457-464.
- McNeil K.J. y Smith A.G. (2010)** A glycine-rich protein that facilitates exine formation during tomato pollen development. *Planta*, 231: 793-808.

- McNevin J.P., Woodward W., Hannoufa A., Feldmann K.A., Lemieux B. (1993) Isolation and characterization of *eceriferum* (*cer*) mutants induced by T-DNA insertions in *Arabidopsis thaliana*. *Genome*, 36: 610–618.
- Medford J.I., Horgan R., El-Sawi Z., Klee H.J. (1989) Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *The Plant Cell*, 1: 403–413.
- Medina M. (2010) *Androesterilidad ligada a la obtención de frutos partenocárpicos en cultivares comerciales de tomate (Solanum lycopersicum L.)*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Medina M., Roque E., Pineda B., Cañas L., Rodríguez-Concepción M., Beltrán J.P., Gómez-Mena C. (2013) Early anther ablation triggers parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 11: 770–779.
- Mehta R.A., Cassol T., Li N., Handa A.K., Mattoo A.K. (2002) Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nature Biotechnology*, 20: 613–618.
- Meinke D.W. (1985) Embryo-lethal mutants of *A. thaliana*: analysis of mutants with a wide range of lethal phases. *Theoretical and Applied Genetics*, 69: 543–552.
- Meinke D.W., Franzman L.H., Nickle T.C., Yeung E.C. (1994) Leafy cotyledon mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 6: 1049–1064.
- Meissner R., Chague V., Zhu Q., Emmanuel E., Elkind Y., Levy A.A. (2000) A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant Journal*, 22: 265–274.
- Meyerowitz E.M., Bowman J.L., Brockman L.L., Drews G.N., Jack T., Sieburth L.E., Weigel D. (1991) A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 113 (Suppl. 1): 157–167.
- Mignolli F., Mariotti L., Lombardi L., Vidoz M.L., Ceccarelli N., Picciarelli P. (2012) Tomato fruit development in the auxin-resistant *dgt* mutant is induced by pollination but not by auxin treatment. *Journal of Plant Physiology*, 169: 1165–1172.
- Miller P. (1754) *The Gardeners Dictionary*. 4th edition. John and Francis Rivington. London, UK.
- Milyaeva E.L., Gurko N.A., Bavrina T.V., Skurat E.V., Dorokhov Y.L., Romanov G. A. (2002) Development of male reproductive organs in an insertion mutant *TPD1* of tobacco characterized by extended flowering. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49: 470–477.
- Mintz-Oron S., Mandel T., Rogachev I., Feldberg L., Lotan O., Yativ M., Wang Z., Jetter R., Venger I., Adato A., Aharoni A. (2008) Gene expression and metabolism in tomato fruit surface tissues. *Plant Physiology*, 147: 823–851.
- Mitchell W.D., Wittwer S.H. (1962) Chemical regulation of flower sex expression and vegetative growth in *Cucumis sativus* L. *Science*, 136: 880–881.
- Mito N., Bennett A.B. (1995) The diageotropica mutation and synthetic auxins differentially affect the expression of auxin-regulated genes in tomato. *Plant Physiology*, 109: 293–297.
- Miyao A., Iwasaki Y., Kitano H., Itoh J.I., Maekawa M., Murata K., Yatou O., Nagato Y., Hirochika H. (2007) A large-scale collection of phenotypic data describing an insertional mutant population to facilitate functional analysis of rice genes. *Plant Molecular Biology*, 63: 625–635.
- Miyao A., Tanaka K., Murata K., Sawaki H., Takeda S., Abe K., Shinozuka Y., Onosato K., Hirochika H. (2003) Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell*, 15: 1771–1780.

- Mockaitis K. and Estelle M (2008)** Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 24: 55–80.
- Modrusan Z., Roiser L., Feldmann K.A., Fischer R.L., Haughn G.W. (1994)** Homeotic transformation of ovules into carpel-like structures in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 6: 333–349.
- Mohan Ram H.Y., Jaiswal V.S. (1972)** Induction of male flowers on female plants of *Cannabis sativa* by gibberellins and its inhibition by abscissic acid. *Planta*, 53: 2543–2545.
- Molesini B., Pandolfini T., Rotino G.L., Dani V., Spena A. (2009)** Aucsia genes silencing causes parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Physiology*, 149: 534–548.
- Molinero-Rosales N., Jamilena M., Zurita S., Gómez P., Capel J., Lozano R. (1999)** FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant Journal*, 20: 685–693.
- Molinero-Rosales N., Latorre A., Jamilena M., Lozano R. (2004)** SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta*, 218: 427–434.
- Moon H.S., Li Y., Stewart Jr N. (2010)** Keeping the genie in the bottle: transgene biocontainment by excision in pollen. *Trends in Biotechnology*, 28: 3–8.
- Moreno V. (1997)** La selección somaclonal, una alternativa biotecnológica para la mejora de plantas ornamentales. *Biotecnología y agricultura: las plantas del futuro. Fundación Bancaixa*. 59–96.
- Moreno V. Garcia Sogo B., Granell A., Roig L.A. (1985)** Plant-regeneration from callo of melon (*Cucumis melo* L. cv. Amarillo Oro). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 5: 139–146.
- Moreno V. and Roig L.A. (1990)** Somaclonal variation in cucurbits. En: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 11. Somaclonal variation in crop improvement I. Springer Verlag Heidelberg, Berlin, pp: 435–464.
- Mueller L.A., Solow T.H., Taylor N., Skwarecki B., Buels R., Binns J., Lin Ch., Wright M., Ahrens R., Wang Y., Herbst E.V., Keyder E., Menda N., Zamir D., Tanksley S.D. (2005)** The SOL genomics network. a comparative resource for solanaceae biology and beyond. *Plant Physiology*, 138: 1310–1317.
- Muños S., Ranc N., Botton E., Berard A., Rolland S., Duffe P., Carretero Y., Le Paslier M.C., Delalande C., Bouzayen M., Brunel D., Causse M. (2011)** Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. *Plant Physiology*, 156: 2244–2254.
- Murray J.A., Jones A., Godin C., Traas J. (2012)** Systems analysis of shoot apical meristem growth and development: integrating hormonal and mechanical signaling. *Plant Cell*, 24: 3907–3919.
- Muschietti J., Dircks L., Vancanneyt G., McCormick S. (1994)** LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant Journal*, 6: 321–338.
- Nakaune M., Hanada A., Yin Y.G., Matsukura C., Yamaguchi S., Ezura H. (2012)** Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52: 28–37.
- Nam J., Mysore K.S., Zheng C., Knue M.K., Matthyse A.G., Gelvin S.B. (1999)** Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. *Molecular and General Genetics*, 261: 429–438.
- Nash A.F., Gardner R.G., Henderson W.R. (1985)** Evaluation of allelism and seed set of eight stamenless tomato mutants. *HortScience*, 20: 440–442.

- Negruk V., Eisner G., Lemieux B. (1996)** Addition-deletion mutations in transgenic *Arabidopsis thaliana* generated by the seed co-cultivation method. *Genome*, 39: 1117–1122.
- Nesbitt T.C. and Tanksley S.D. (2001)** fw2.2 directly affects the size of developing tomato fruit, with secondary effects on fruit number and photosynthate distribution. *Plant Physiology*, 127: 575–583.
- Nester J.E. y Zeevaart J.A.D. (1988)** Flower development in normal tomato and a gibberellin-deficient (*ga-2*) mutant. *American Journal of Botany*, 75: 45-55.
- Nilsson E. (1950)** Some experiments with tetraploid tomatoes. *Hereditas*, 36: 181-204.
- Nitsch J. (1950)** Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *American Journal of Botany*, 37: 211–215.
- Nitsch J. (1970)** Hormonal factors in growth development. *The Biochemistry of Fruits and their Products (Vol. 2)*. Editions Hulme, A.C. pp. 427–472.
- Nitsch L., Kohlen W., Oplaat C., Charnikhova T., Cristescu S., Michieli P., Wolters-Arts M., Bouwmeester H., Mariani, C., Vriezen W.H., Rieu I. (2012)** ABA-deficiency results in reduced plant and fruit size in tomato. *Journal of Plant Physiology*, 169: 878–883.
- Nuez F., Costa J., Cuartero J. (1986)** Genetics of the parthenocarp for tomato varieties “Sub-Artic Plenty”, “75/59” and “Severianin”. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 96: 200-206.
- Ogarkova O.A., Tomilova N.B., Tomilov A.A., Tarasov V.A. (2001)** Collection of *Arabidopsis thaliana* morphological insertion mutants. *Russian Journal of Genetic*, 37: 899–904.
- Oh K., Ivanchenko M.G., White T.J., Lomax T.L. (2006)** The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. *Planta*, 224: 133–144.
- Ohad N., Margossian L., Hsu Y.-C. Williams C., Repetti P., Fischer R.L. (1996)** A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 5319-5324.
- Ohba T., Yoshioka Y., Machida Ch., Machida Y. (1995)** DNA rearrangement associated with the integration of T-DNA in tobacco: an example for multiple duplications of DNA around the integration target. *The Plant Journal*, 7: 157–164.
- Olimpieri, I., Caccia R., Picarella M.E., Pucci A., Santangelo E., Soressi G.P., Mazzucato A. (2011)** Constitutive co-suppression of the *GA 20-oxidase1* gene in tomato leads to severe defects in vegetative and reproductive development. *Plant Science*, 180: 496–503.
- Olimpieri I. and Mazzucato A. (2008)** Phenotypic and genetic characterization of the *pistillate* mutation in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 151-163.
- Olimpieri I., Siligato F., Caccia R., Mariotti L., Ceccarelli N., Soressi G.P., Mazzucato A. (2007)** Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta*, 226: 877– 888.
- Olszewski N., Sun T.P., Gubler F. (2002)** Gibberellin signalling, biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, 14: 61-80.
- Oosumi T., Gruszewski H. A., Blischak L.A., Baxter A.J., Wadl P.A., Shuman J.L., Veilleux R.E., Shulaev V. (2006)** High-efficiency transformation of the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) for functional genomics. *Planta*, 223: 1219–1230.
- Ori N., Juarez M.T., Jackson D., Yamaguchi J., Banowitz G.M., Hake S. (1999)** Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *The Plant Cell*, 11: 1073–1080.
- Owen H.A., Makaroff C.A. (1995)** Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma*, 185: 7–21.

- Ozga J.A. and Reinecke D.M. (2003)** Hormonal interactions in fruit development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22: 73-81.
- Ozga J. A., van Huizen R., Reinecke D.M. (2002)** Hormone and seed-specific regulation of pea fruit growth. *Plant Physiology*, 128: 1379–1389.
- Pacini E. (1990)** Tapetum and microspore function. En: Blackmore S. y Knox R.B. (eds.) *Microspores: evolution and ontogeny*. Ediciones Academic Press, London.
- Pacini E. (1996)** Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction*, 9: 362–366.
- Pacini E., Franchi G.G., Hesse M. (1985)** The tapetum: its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Systematics and Evolution*, 149: 155-185.
- Pandolfini T., Molesini B., Spena A. (2007)** Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends in Plant Science*, 12: 327–329.
- Pandolfini T., Rotino G.L., Camerini S., Defez R., Spena A. (2002)** Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotechnology*, 2(1).
- Parish R. y Li S.F. (2010)** Death of a tapetum: a programme of developmental altruism. *Plant Science*, 178: 73-89.
- Pascual L., Blanca J.M., Cañizares J., Nuez F. (2009)** Transcriptomic analysis of tomato carpel development reveals alterations in ethylene and gibberellin synthesis during *pat3/pat4* parthenocarpic fruit set. *BMC Plant Biology*, 9: 67.
- Pattison R.J. and Catala C. (2012)** Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the *PIN* and *AUX/LAX* gene families. *Plant Journal*, 70: 585–598.
- Pelaz S., Ditta G.S., Baumann E., Wisman E., Yanofsky M.F. (2000)** B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS – box genes. *Nature*, 405: 200 – 203.
- Peng H., Huang H., Yang Y., Zhai Y., Wu J., Huang D., Lu T. (2005)** Functional analysis of GUS expression patterns and T-DNA integration characteristics in rice enhancer trap lines. *Plant Science*, 168: 1571–1579.
- Peng J., Carol P., Richards D.E., King K.E., Cowling R.J., Murphy G.P., Harberd N.P. (1997)** The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes and Development*, 11: 3194–3205.
- Peralta I.E and Spooner D.M. (2007)** History, origin and early cultivation of tomato (solanaceae). En: Razdan M.K. and Matto A.K. (eds.) *Genetic improvement of solanaceous crops*, 2: *Tomato*. Science Publishers, Enfield, EE.UU.
- Peterhans A., Schlüpmann H., Basse C., Paszkowski J. (1990)** Intrachromosomal recombination in plants. *EMBO Journal*, 9(1): 3437–3445.
- Peterson D.G., Pearson W.R., Stack S.M. (1998)** Characterization of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) genome using *in vitro* and *in situ* DNA reassociation. *Genome*, 41: 346-356.
- Philouze J. and Maisonneuve B. (1978)** Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the Soviet variety Severianin. *Tomato Genetics Cooperative Reports*, 28: 12-13.
- Picken A.J.F. (1984)** A review of pollination and fruit set in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Journal of Horticultural Science*, 59: 1–13.
- Pike L.M., Peterson C.E. (1969)** Gibberellin A4/A7, for induction of staminate flowers on the gynoeceum cucumber. *Euphytica*, 18: 106-109.
- Pineda B., Giménez-Caminero E., García-Sogo B., Antón M.T., Atarés A., Capel J., Lozano R., Angosto T., Moreno V. (2010)** Genetic and physiological characterization of the *Arlequin*

- insertional mutant reveals a key regulator of reproductive development in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 51: 435-447.
- Pinyopich A., Ditta G.S., Savidge B., Liljegen S.J., Baumann E., Wisman E., Yanofsky M.J. (2003)** Assessing the redundancy MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*, 424: 85–88.
- Plackett A.R.G., Ferguson A.C., Powers S.J., Wanchoo-Kohli A., Phillips A.L., Wilson Z.A., Hedden P., Thomas S.G. (2014)** DELLA activity is required for successful pollen development in the Columbia ecotype of Arabidopsis. *New Phytologist*, 201: 825-836.
- Pnueli L., Abu-Abeid M., Zamir D., Nacken W., Schwarz-Sommer Z., Lifschitz E. (1991)** The MADS-box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from Antirrhinum and Arabidopsis. *The Plant Journal*, 1: 255-266.
- Pnueli L., Goren L.C., Hareven D., Gutfinger T., Alvarez J., Ganai M., Zamir D., Lifschitz E. (1998)** The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development*, 125: 1979–1989.
- Pnueli L., Hareven A., Rounsley S. D. Yanofsky M. F., Lifschitz E. (1994a)** Isolation of the Tomato *AGAMOUS* gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell*, 6: 163–173.
- Pnueli L., Hareven D., Broday L., Hurwitz Ch., Lifschitz E. (1994b)** The *TM5* MADS Box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. *Plant Cell*, 6: 175–186.
- Proels R.K., Gonzalez M.C., Roitsch T. (2006)** Gibberellin-dependent induction of tomato extracellular invertase *Lin7* is required for pollen development. *Functional Plant Biology*, 33: 547-554.
- Qin G., Kang D., Dong Y., Shen Y., Zhang L., Deng X., Zhang Y., Li S., Chen N., Niu W., Chen C., Liu P., Chen H., Li J., Ren Y., Gu H., Deng X., Li-Jia Q., Chen Z. (2003)** Obtaining and analysis of flanking sequences from T-DNA transformants of *Arabidopsis*. *Plant Science*, 165: 941–949.
- Quinet M., Dielen V., Batoko H., Boutry M., Havelange A., Kinet J.M. (2006a)** Genetic interactions in the control of flowering time and reproductive structure development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phytologist*, 170: 701–710.
- Quinet M., Dubois C., Goffin M.C., Chao J., Dielen V., Batoko H., Boutry M., Kinet J.M. (2006b)** Characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) mutants affected in their flowering time and in the morphogenesis of their reproductive structure. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1381-1390.
- Quinet M. y Kinet J.M. (2007)** Transition to flowering and morphogenesis of reproductive structures in tomato. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 1: 64-74.
- Radhamony R.S., Prasad A.M., Srinivasan R. (2005)** T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8: 83–106.
- Raghavan V. (2003)** Some reflections on double fertilization, from its discovery to the present. *New Phytologist*, 159: 565–583.
- Rao A.V., Rao L.G. (2007)** Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55: 207-216.
- Rappaport L. (1957)** Effect of gibberellin on growth, flowering and fruiting of the Earlypak tomato, *Lycopersicum Esculentum*. *Plant Physiology*, 32: 440–444.
- Reed J.W. (2001)** Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 6: 420–425.

- Reinhardt D., Mandel T., Kuhlemeier C. (2000)** Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*, 12: 507–518.
- Reinhardt D., Pesce E.-R., Stieger P., Mandel T., Baltensberger K., Bennett Traas J., Friml J., Kuhlemeier C. (2003)** Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 426: 255–260.
- Ren Z., Li Z., Miao Q., Yang Y., Deng W., Hao Y. (2011)** The auxin receptor homologue in *Solanum lycopersicum* stimulates tomato fruit set and leaf morphogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 62: 2815–2826.
- Renak D., Gibalova A., Solcova K., Honys D. (2014)** A new link between stress response and nucleolar function during pollen development in *Arabidopsis* mediated by AtREN1 protein. *Plant, Cell & Environment*, 37: 670–683.
- Reynolds, M., Foulkes M.J., Slafer G.A., Berry P., Parry M.A.J., Snape J.W., Angus W.J. (2009)** Raising yield potential in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1899–1918.
- Richards D.E., King K.E., Ait-ali T., Harberd N.P. (2001)** How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signalling. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 67–88.
- Rick C.M. (1948)** Genetics and development of nine male-sterile tomato mutants. *Hilgardia*, 18:599-633.
- Rick C.M. (1978)** The tomato. *Scientific American*, 239: 77-87.
- Rick C.M. (1995)** Tomato (*Lycopersicon esculentum*). En: Evolution of Crop Plants, 2nd Edition. Smartt J. and Simmonds N.W. (eds.). Longman, London. pp. 452-457.
- Rick C.M. y Butler L. (1956)** Cytogenetics of tomato. *Advances in Genetic*, 8: 267–382.
- Rick C.M. y Sawant A.C. (1955)** Factor interactions affecting the phenotypic expression of the jointless character in tomatoes. *American Society for Horticultural Science*, 66: 354–360.
- Riechmann J. L. and Ratcliffe O. J. (2000)** A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(5): 423–434.
- Rieu I., Wolters-Arts M., Derksen J., Mariani C., Weterings K. (2003)** Ethylene regulates the timing of anther dehiscence in tobacco. *Planta*, 217: 131-137.
- Robinson-Beers K., Pruitt R.E., Gasser C.S. (1992)** Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and female-sterile mutants. *Plant Cell*, 4: 1237–1249.
- Robles P. y Pelaz S. (2005)** Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Developmental Biology*, 49: 633 – 643.
- Robson P.R.H., Donnison I.S., Wang K., Frame B., Pegg S.E., Thomas A., Thomas H. (2004)** Leaf senescence is delayed in maize expressing the *Agrobacterium IPT* gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. *Plant Biotechnology Journal*, 2: 101–112.
- Ross J.J., O'Neill D.P., Smith J.J., Kerckhoffs H.J., Elliott R.C. (2000)** Evidence that auxin promotes gibberellin A₁ biosynthesis in pea. *The Plant Journal*, 21: 547-552.
- Rotino G.L., Acciarri N., Sabatini E., Mennella G., Scalzo R.L., Maestrelli A., Molesini B., Pandolfini T., Scalzo J., Mezzetti B., Spena A. (2005)** Open field trial of genetically modified parthenocarpic tomato: seedlessness and fruit quality. *BMC Biotechnology*, 5: 32.
- Ruan Y.L., Patrick J.W., Bouzayen M., Osorio S., Fernie, A.R. (2012)** Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends in Plant Science*, 17: 656–665.
- Rylski I. (1973)** Effect of night temperature on shape and size of sweet pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 98: 149-152.

- Saito T., Ariizumi T., Okabe Y., Asamizu E., Hiwasa-Tanase K., Fukuda N., Mizoguchi T., Yamazaki Y., Aoki K., Ezura H. (2011) TOMATOMA: a novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections. *Plant & Cell Physiology*, 52: 283-296.
- Sakamoto T., Miura K., Itoh H., Tatsumi T., Ueguchi-Tanaka M., Ishiyama K., Kobayashi M., Agrawal G.K., Takeda S., Abe K., Miyao A., Hirochika H., Kitano H., Ashikari M., Matsuoka M. (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiology*, 134: 1642–1653.
- Sakata T., Oda S., Tsunaga Y., Shomura H., Kawagishi-Kobayashi M., Aya K., Saeki K., endo T., Nagano K., Kojima M., Sakakibara H., Watanabe M., Matsuoka M., Higashitani A. (2014) Reduction of gibberellin by low temperatura disrupts pollen development in rice. *Plant Physiology*, 164: 2011-2019.
- Sallaud C., Gay C., Larmande P., Bès M., Piffanelli P., Piegú B., Droc G., Regad F., Bourgeois E., Meynard D., Périn C., Sabau X., Ghesquière A., Glaszmann J.C., Delseny M. and Guiderdoni E. (2004) High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards *in silico* reverse genetics. *Plant Journal*, 39: 450–464.
- Sánchez-León N. y Vielle-Calzada J.P. (2010) Development and function of the female gametophyte. En: Pua E.-C., Davey M.R. (eds.) *Plant developmental biology – Biotechnological perspectives. Volume 1*. Ediciones Springer, Heidelberg. pp. 209-224.
- Sanders P.M., Lee P.Y., Biesgen C., Boone J.D., Beals T.P., Weiler E.W., Goldberg R.B. (2000) The *Arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell*, 12: 1041-1061.
- Sastry K.K.S. and Muir R.M (1963) Gibberellin: effect on diffusable auxin in fruit development. *Science*, 140: 494-495.
- Sawhney V.K. (1974) Morphogenesis of the *stamenless-2* mutant of tomato: III. Relative levels of gibberellins in the normal and mutant plants. *Journal of Experimental Botany*, 25: 1004–1009.
- Sawhney V.K. (1992) Floral mutants in tomato: development, physiology and evolutionary implications. *Canadian Journal of Botany*, 81: 1640–1647.
- Sawhney V.K. y Greyson R.I. (1972) Initiation of inflorescence and floral organs in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Canadian Journal of Botany*, 50: 1493-1495.
- Sawhney, V.K. y Shukla A. (1994) Male sterility in flowering plants: Are plant growth substances involved? *American Journal of Botany*, 81: 1640–1647.
- Scanlon M.J. (2003) The polar auxin transport inhibitor *N*-1-Naphthylphthalamic acid disrupts leaf initiation, KNOX protein regulation, and formation of leaf margins in maize. *Plant Physiology*, 133: 597–605.
- Schijlen E.G., deVos C.H., Martens S., Jonker H.H., Rosin F.M., Molthoff J.W., Tikunov Y.M., Angenent G.C., vanTunen A.J., Bovy A.G. (2007) RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiology*, 144: 1520–1530.
- Schmitz G., Tillmann E., Carriero F. Fiore C., Cellini F., Theres K. (2002) The tomato *BLIND* gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 1064–1069.
- Scholte M., d’Erfurth I., Rippa S., Mondy S., Cosson V., Durand P., Breda C., Trinh H., Rodriguez-Llorente I., Kondorosi E., Schultze M., Kondorosi A., Ratet P. (2002) T-DNA tagging in the model legume *Medicago truncatula* allows efficient gene discovery. *Molecular Breeding*, 10: 203–215.

- Schumacher K., Schmitt T., Rossberg M., Schmitz G., Theres K. (1999) The *LATERAL SUPPRESSOR (LS)* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 290–295.
- Schupp J.M., Price L.B., Klevytska A., Keim P. (1999) Internal and flanking sequence from AFLP fragments using ligation-mediated suppression PCR. *Biotechniques*, 26: 5: 905–910.
- Schwabe W.W., Mills J.J. (1981) Hormones and parthenocarpic fruit set. A literature survey. *Horticultural Abstracts*, 51: 661-698.
- Schwacke R., Grallath S., Breitzkreuz K.E., Stransky E., Stransky H., Frommer W.B., Rentsch D. (1999) LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell*, 11: 377–391.
- Scott R.J., Spielman M., Dickinson H.G. (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell*, 16: S46-S60.
- Seavey S.R., Mangels S.K., Chappel N.J. (2000) Unfertilized ovules of *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) continue to grow in developing fruits. *American Journal of Botany*, 87: 1765-1768.
- Senatore A., Trobacher C.P., Greenwood J.S. (2009) Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato. *Plant Physiology*, 149: 775-790.
- Serrani J.C., Carrera E., Ruiz-Rivero O., Gallego-Giraldo L., Pereira Peres L.E., García-Martínez J.L. (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: 851-862.
- Serrani J.C., Fos M., Atares A., Garcia-Martinez J.L. (2007a) Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv MicroTom of tomato. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26: 211–221.
- Serrani J.C., Ruiz-Rivero O., Fos M., García-Martínez J.L. (2008) Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *Plant Journal*, 56: 922–934.
- Serrani J.C., Sanjuán R., Ruiz-Rivero O., Fos M., García-Martínez J.L. (2007b) Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiology*, 145: 246–257.
- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C, Clarke J.D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T., Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M., Goffsessions S.A. (2002) A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell*, 14: 2985-2994.
- Shalit A., Rozman A., Goldshmidt A., Alvarez J.P., Bowman J.L., Eshed Y., Lifschitz E. (2009) The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 8392-8397.
- Sheng J., Ye J., Shen L., Luo Y. (2003) Effect of lipoxygenase and jasmonic acid on ethylene biosynthesis during tomato fruit ripening. *Acta Horticulturae*, 620: 119-125.
- Sheoran I.S., Ross A.R.S., Olson D.J.H., Sawhney V.K. (2009) Differential expression of proteins in the wild type and 7B-1 male-sterile mutant anthers of tomato (*Solanum lycopersicum*): a proteomic analysis. *Journal of Proteomics*, 71: 624-636.
- Shi H. Reiter R.J., Tan D.X., Chan Z. (2015) *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 17* positively modulates natural leaf senescence through melatonin-mediated pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Pineal Research*, 58: 26-33.
- Shinozaki Y. Hao S., Kojima M., Sakakibara H., Ozeki-lida Y., Zheng Y., Fei Z., Zhong S., Giovannoni J.J., Rose J.K.C., Okabe Y., Heta Y., Ezura H., Ariizumi T. (2015) Ethylene suppresses tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit set through modification of gibberellin metabolism. *The Plant Journal*, 83: 237-251.

- Ship J.L., Whitfield G.H., Papadopoulos A.P. (1994)** Effectiveness of the bumble bee, *Bombus impatiens* Cr. (Hymenoptera: Apidae), as a pollinator of greenhouse sweet pepper. *Scientia Horticulturae*, 17: 101-106.
- Shivanna K.R. y Johri B.M. (1985)** *The angiosperm pollen; structure and functions*. Ediciones John Wiley and Sons, New Delhi.
- Sicard A., Petit J., Mouras A., Chevalier C., Hernould M. (2008)** Meristem activity during flower and ovule development in tomato is controlled by the mini zinc finger gene *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY*. *Plant Journal*, 55: 415-427.
- Sinha, N.R., Williams, R.E., Hake, S. (1993)** Overexpression of the maize homeobox gene, *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes and Development*, 7: 787-795.
- Smart C.M., Scofield S.R., Bevan M.W., Dyer T.A. (1991)** Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. *Plant Cell*, 3: 647-656.
- Smirnova A., Leide J., Riederer M. (2013)** Deficiency in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-Coenzyme A synthase of tomato impairs microgametogenesis and causes floral organ fusion. *Plant Physiology*, 161: 196-209.
- Smith O. (1935)** *Pollination and life-history studies of the tomato (Lycopersicon esculentum Mill)*. Cornell University, Agricultural Experiment Station. Paper 133.
- Smulders M.J.M., Ruskortekaas W., Gilissen L.J.W. (1994)** Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science*, 97: 53-60.
- Soressi G.P. and Salamini F. (1975)** A monomendelian gene inducing parthenocarpic fruits. *Report Genetic Cooperative*, 25:22.
- Spena A., Estruch J.J., Prinsen E., Nacken W., Van Onckelen H., Sommer H. (1992)** Anther-specific expression of the *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* increases content in anthers and alters anther development and whole flower growth. *Theoretical and Applied Genetics*, 84: 520-527.
- Springer P.S. (2000)** Gene traps: tools for plant development and genomics. *Plant Cell*, 12: 1007-1020.
- Springer P.S., McCombie W.R., Sundaresan V., Martienssen R.A. (1995)** Gene trap tagging of *PROLIFERA*, an essential *MCM2-3-5*-like gene in *Arabidopsis*. *Science*, 268: 877-880.
- Srivastava L.M. (2002)** Plant Growth and Development. *Hormones and Environment*. Academic Press. London, UK. pp 166-167.
- Srivastava A. y Handa A.K. (2005)** Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24: 67-82.
- Stachel S.E., An G., Flores C., Nester E.W. (1985)** A TN3 LACZ transposon for the random generation of beta-galactosidase gene fusions – Application to the analysis of gene-expression in *Agrobacterium*. *EMBO Journal*, 4: 891-898.
- Stubbe H. (1957)** Mutanten der Kulturtomate *Lycopersicon esculentum* Miller I. Kulturpflanze, 5: 110-220.
- Stubbe H. (1963)** Mutanten der Kulturtomate *Lycopersicon esculentum* Miller IV. Kulturpflanze, 11: 603-644.
- Su L., Bassa C., Audran C., Mila I., Cheniclet C., Chevalier C., Bouzayen M., Roustan J.P., Chervin C. (2014)** The auxin *Sl-IAA17* transcriptional repressor controls fruit size via the

- regulation of endoreduplication-related cell expansion. *Plant and Cell Physiology*, 55(11): 1969-1976.
- Sun T.P. and Gubler F. (2004)** Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 197–223.
- Sundaresan V., Springer P., Volpe T., Haward S., Jones J. Dean C., Ma H., Martienssen R. (1995)** Patterns of gene action in plant development by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes and Development*, 9: 1797–1810.
- Suresh Kumar G., Trivedi D., Srivastava S., Joshi S., Halder N., Verma S.D. (2003)** Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development: an in vitro and in vivo study. *Nutrition*, 19: 794-799.
- Suzaki T., Sato M., Ashikari M., Miyoshi M., Nagato Y., Hirano H.Y. (2004)** The gene *FLORAL ORGAN NUMBER1* regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to *Arabidopsis CLAVATA1*. *Development*, 131: 5649–5657.
- Suzuki Y., Uemura S., Saito Y., Murofushi N., Schmitz G., Theres K. Yamaguchi I. (2001)** A novel transposon tagging element for obtaining gain of function mutants based on a self-stabilizing *Ac* derivative. *Plant Molecular Biology*. 45: 123–131.
- Svitashev S.K., Pawlowski W.P., Makarevitch I., Plank D.W., Somers D.A. (2002a)** Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *Plant Journal*, 32: 433–445.
- Svitashev S.K. and Somers D.A. (2002b)** Characterization of transgene loci in plants using FISH: a picture is worth a thousand words. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 205–214.
- Swaminathan K., Yang Y., Grotz N., Campisi L., Jack T. (2000)** An enhancer trap line associated with a D- Class cyclin gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124: 1658–1667.
- Szymkowiak E.J. and Irish E.E. (1999)** Interactions between *jointless* and wild-type tissues during development of the pedicel abscission zone and the inflorescence meristem in tomato graft chimeras. *Plant Cell*, 11: 159-175.
- Szymkowiak E.J. and Irish E.E. (2006)** *JOINTLESS* suppresses sympodial identity in inflorescence meristems of tomato. *Plant Journal*, 4: 1-7.
- Szymkowiak E.J. and Sussex I.M. (1992)** The internal meristem layer (L3) determines floral meristem size and carpel number in tomato periclinal chimeras. *Plant Cell*, 4: 1089–1100.
- Taguchi-Shiobara F., Yuan Z., Hake S., Jackson D. (2001)** The fasciated *ear2* gene encodes a leucine-rich repeat receptor-like protein that regulates shoot meristem proliferation in maize. *Genes and Development*, 15: 2755–2766.
- Tal M. (1966)** Abnormal stomatal behavior in wilted mutants of tomato. *Plant Physiology*, 41: 1387–1391.
- Tal M. and Nevo Y. (1973)** Abnormal stomatal behavior and root resistance, and hormonal imbalance in three wilted mutants of tomato. *Biochemistry Genetics*, 8: 291–300.
- Talon M., Zacarias L., Primomillo E. (1990)** Hormonal changes associated with fruit-set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Physiologia Plantarum*, 79: 400–406.
- Takano M., Egawa H., Ikeda J.E., Wakasa K. (1997)** The structures of integration sites in transgenic rice. *Plant Journal*, 11: 353–361.
- Tax F.E. and Vernon D.M. (2001)** T-DNA-associated duplication/translocations in *Arabidopsis*: implications for mutant analysis and functional genomics. *Plant Physiology*, 126: 1527–1538.

- The Tomato Genome Consortium (2012)** The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485: 635-641.
- Thomas S.G., Sun T.P. (2004)** Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiology*, 135: 668-676.
- Thomasset B., Ménard M., Boetti H., Denmat L.A., Inzé D., Thomas D. (1996)** β -glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic tobacco cells: specific elimination of plant inhibitors and minimization of endogenous GUS background. *Plant Science*, 113: 209-219.
- Tieman D.M., Ciardi J.A., Taylor M.G., Klee J. (2001)** Members of the tomato *LeEIL* (*EIN3-like*) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant Journal*, 26: 47-58.
- Tieman D.M. y Klee H.J. (1999)** Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiology*, 120: 165-172.
- Tinland, B. (1996)** The Integration of T-DNA into Plant Genomes. *Trends in Plant Science*, 1: 178-183.
- Tiwari S.B., Wang X.J., Hagen G., Guilfoyle T.J. (2001)** Aux/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *The Plant Cell*, 13: 2809-2822.
- Topping J.F., Agyeman F., Henricot B., Lindsey K. (1994)** Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *Plant Journal*, 5: 895-903.
- Topping J.F. y Lindsey K. (1995)** Insertional mutagenesis and promoter trapping in plants for the isolation genes and the study of development. *Transgenic Research*, 4: 291-305.
- Topping J.F., Wei W., Lindsey K. (1991)** Functional tagging of regulatory elements in the plant genome. *Development*, 112: 1009-1019.
- Tronickova, E. 1962.** New type of functional male sterility in tomato. *Ved Prace Vysk Ust Rostl Vyr Praha-Ruzine* 6: 29-39.
- Turck F., Fornara F., Coupland G. (2008)** Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 573-594.
- Twell D. (2010)** Male gametophyte development. En: Pua E.-C., Davey M.R. (eds.) *Plant developmental biology – Biotechnological perspectives. Volume 1*. Ediciones Springer, Heidelberg. pp. 225-244.
- Tzfira T. and Citovsky V. (2001)** Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends in Cell Biology*, 12: 121-128.
- Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1999)** Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *The Plant Journal*, 19: 309-319.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1997)** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*, 9: 1963-1971.
- Vain P., Worland B., Thole V., McKenzie N., Alves S.C., Opanowicz M., Fish L.J., Bevan M.W., Snape J.W. (2008)** *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal*, 6: 236-245.
- Vallejo C.F.A. (1999)** *Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia. Cali, Colombia. p. 209.
- Van der Hoeven R., Ronning C., Giovannoni J., Martin G., Tanksley S. (2002)** Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell*, 14: 1441-1456.

- van der Knaap E., Chakrabarti M., Chu Y.H., Clevenger J.P., Illa-Berenguer E., Huang Z., Keyhaninejad N., Mu Q., Sun L., Wang Y., Wu S. (2014) What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Frontiers in Plant Science*, 5: 227.
- Van Lijsebettens M., Vanderhaeghen R., van Montagu M. (1991) Insertional Mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of T-DNA-Linked mutation that alters leaf morphology. *Theoretical and Applied Genetics*, 81: 277–284.
- Van Tuinen A., Peters A.H.L.J., Kendrick R.E., Zeevaart J.A.D., Koornneef M. (2002) Characterisation of the *procera* mutant of tomato and the interaction of gibberellins with end-of-day far-red light treatments. *Physiologia Plantarum*, 106: 121–128.
- Vardhini B.V. y Rao S.S.R. (2002) Acceleration of ripening of tomato pericarp discs by brassinosteroids. *Phytochemistry*, 61: 843–847.
- Vardy E., Lapushner D., Genizi A., Hewitt J. (1989) Genetics of parthenocarp in tomato under a low temperature regime: II cultivar “Severianin”. *Euphytica*, 41: 9–15.
- Varga A., Bruinsmaa J. (1976) Roles of seeds and auxins in tomato fruit growth. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 80: 95–104.
- Varoquaux F., Blanvillain R., Delseny M., Gallois P. (2000) Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Tibtech*, 18: 233–242.
- Vivian-Smith A., Luo M., Chaudhury A., Koltunow A.M. (2001) Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development*, 128: 2321–2331.
- Vogler H. and Kuhlemeier C. (2003) Simple hormones but complex signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 51–56.
- Vrebalov J., Ruezinsky D., Padmanabhan V., White R., Medrano D., Drake R., Schuch W., Giovannoni J. (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*, 296: 343–346.
- Vriezen W.H., Feron R., Maretto F., Keijman J., Mariani C. (2008) Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist*, 177: 60–76.
- Wang H., Jones B., Li Z., Frasse P., Delalande C., Regad F., Chaabouni S., Latché A., Pech J.C., Bouzayen M. (2005) The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *The Plant Cell*, 17: 2676–2692.
- Wang H., Schauer N., Usadel B., Frasse P., Zouine M., Hernould M., Latché A., Pech J.C., Fernie A.R., Bouzayen M. (2009) Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. *Plant Cell*, 21: 1428–1452.
- Wang N., Long T., Yao W., Xiong L., Zhang Q., Wu C. (2013) Mutant resources for the functional analysis of the rice genome. *Molecular Plant*, 6(3): 596–604.
- Wang S., Chang Y., Guo J., Chen J.G. (2007) Arabidopsis Ovate Family Protein 1 is a transcriptional repressor that suppresses cell elongation. *Plant Journal*, 50: 858–872.
- Wasson A.P., Pellerone F.I., Mathesius U. (2006) Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell*, 18: 1617–1629.
- Webb K.J., Skot L., Nicholson M.N., Jorgensen B., Mizen, S. (2000) *Mesorhizobium loti* increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 13: 606–616.

- Weiss D. and Ori N. (2007) Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiology*, 144: 1240–1246.
- Wen Ch.K. and Chang C. (2002) *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *The Plant Cell*, 14: 87–100.
- Wilkinson J.Q., Lanahan M.B., Clark D.G. Bleeker A.B., Chang C., Meyerowitz E.W., Klee H.J. (1997) A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nature Biotechnology*, 15: 444-447.
- Wismer P.T., Proctor J.T.A., Elfving, D.C. (1995) Benzyladenine affects cell-division and cell-size during apple fruit thinning. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 120: 802–807.
- Wolters A.M.A., Trindade L.M., Jacobsen E., Visser R.G.F. (1998) Fluorescence *in situ* hybridization on extended DNA fibres as a tool to analyse complex T-DNA loci in potato. *Plant Journal*, 13(6): 837–847.
- Wozniak C.A. and Owens L.D. (1994) Native β -glucuronidase activity in sugar-beet (*Beta vulgaris*). *Physiologia Plantarum*, 90: 763-771.
- Wu J., Zhang Z., Zhang Q., Han Q., Gu X., Lu T. (2015a) The molecular cloning and clarification of a photorespiratory mutant, *oscdm1*, using enhancer trapping. *Frontiers in Genetics*, 6: 226.
- Wu K., Erdman J.W. Jr., Schwartz S.J., Platz E.A., Leitzmann M., Clinton S.K., DeGross V., Willett W.C., Giovannucci E. (2004) Plasma and dietary carotenoids, and the risk of prostate cancer: a nested case-control study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 13: 260-269.
- Wu S., Clevenger J.P., Sun L., Visa S., Kamiya Y., Jikumaru Y., Blakeslee J., van der Knaap E. (2015b) The control of tomato fruit elongation orchestrated by *sun*, *ovate* and *fs8.1* in a wild relative of tomato. *Plant Science*, 238: 95-104.
- Wubs, A.M. Heuvelink E., Marcelis L.F.M. Hemerik L. (2011) Quantifying abortion rates of reproductive organs and effects of contributing factors using time-to-event analysis. *Functional Plant Biology*, 38: 431–440.
- Xiao H., Jiang N., Schaffner E.K., Stockinger E.J., Van der Knaap E. (2008) A retrotransposon-mediated gene duplication underlies morphological variation of tomato fruit. *Science*, 319: 1527–1530.
- Xiao J., Li H., Zhang J., Chen R., Zhang Y., Ouyang B., Wang T., Ye Z. (2006) Dissection of *GA 20-oxidase* members affecting tomato morphology by RNAi-mediated silencing. *Plant Growth Regulators*, 50: 179–189.
- Yadegari R., de Paiva G.R., Laux T., Koltunow A. M., Apuya N., Zimmerman J. L., Fischer R. L., Harada J. J., Goldberg R. B. (1994) Cell differentiation and morphogenesis are uncoupled in *Arabidopsis* raspberry embryos. *Plant Cell*, 6: 1713–1729.
- Yamamoto Y., Nishimura M., Hara-Nishimura I., Noguchi T. (2003) Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 44: 1192–1201.
- Yamamoto N., Tsugane T., Watanabe M., Yano K., Maeda F., Kuwata C., Torki M., Ban Y., Nishimura S., Shibata D. (2005) Expressed sequence tags from the laboratory-grown miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom and mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in tomato cultivars. *Gene*, 356: 127-134.
- Yang Y., Peng H., Huang H., Wu J., Jia Sh., Huang D., Lu T. (2004) Large-scale production of enhancer trapping lines for rice functional genomics. *Plant Science*, 167: 281–288.

- Yang J., Zhang J., Huang Z., Wang Z., Zhu Q., Liu L. (2002) Correlation of cytokinin levels in the endosperms and roots with cell number and cell division activity during endosperm development in rice. *Annals of Botany*, 90: 369–377.
- Yano K., Aoki K., Shibata D. (2007) Genomic databases for tomato. *Plant Biotechnology*, 24: 17–25.
- Yanofsky M.F., Hong Ma., Bowman J.L., Drews G.N., Feldmann K.A., Meyerowitz E.M. (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *Agamous* resembles transcription factors. *Nature*, 346: 35–39.
- Yao J.L., Dong Y.H., Morris B.A.M. (2001) Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 98: 1306–1311.
- Yeager A.F. (1927) Determinate growth in the tomato. *Journal of Heredity*, 18: 263–265.
- Yokotani N., Tamura S., Nakano R., Inaba A., Kubo Y. (2003) Characterization of a novel tomato *EIN3*-like gene (*LeEIL4*). *Journal of Experimental Botany*, 54: 2775–2776.
- Zhang N., Brewer M.T., Van Der Knaap E. (2012) Fine mapping of *fw3.2* controlling fruit weight in tomato. *Theoretical Applied Genetics*, 125: 273–284.
- Zhang Z.B., Zhu J., Gao J.F., Wang Ch., Li H., Li H., Zhang H. Q., Zhang S., Wang D.M., Wang Q.X., Huang H., Xia H.J., Yang Z.N. (2007) Transcription factor *AtMYB103* is required for anther development by regulating tapetum development, callose dissolution and exine formation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 52: 528–538.
- Zhao T., Palotta M., Langridge P., Prasad M., Graner A., Schulze-Lefert P., Koprek T. (2006) Mapped Ds/T-DNA launch pads for functional genomics in Barley. *Plant Journal*, 47 (5): 811–826.
- Zhu H.L., Zhu B.Z., Shiao Y., Wang X.G., Lin X.J., Xie Y.H., Li Y.C., Gao H.Y., Luo Y.B. (2006) Tomato fruit development and ripening are altered by the silencing of *LeEIN2* gene. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48: 1478–1485.
- Zhu Y., Nam J., Carpita N. C., Matthyse A. G., Gelvin S. B. (2003a) *Agrobacterium*-mediated root transformation is inhibited by mutation of an *Arabidopsis* cellulose synthase-like gene. *Plant Physiology*, 133: 1000–1010.
- Zhu Y., Nam J., Humara J.M., Mysore K.S., Lee L.Y., Cao H., Valentine L., Li J., Kaiser A.D., Kopecky A.L., Hwang H.-H., Bhattacharjee S., Rao P. K., Tzfira T., Rajagopal J., Yi H., Veena, Yadav B.S., Crane Y.M., Lin K., Larcher Y., Gelvin M.J. K., Knue M., Ramos C., Zhao X., Davis S.J., Kim S., Ranjith-Kumar C. T., Choi Y.J., Hallan V. K., Chattopadhyay S., Sui X., Ziemienowicz A., Matthyse A.G., Citovsky V., Hohn B., Gelvin S.B. (2003b) Identification of *Arabidopsis* *rat* mutants. *Plant Physiology*, 132: 494–505.
- Zijlstra S. (1985) Parthenocarpie in tomaat; twee nieuwe lijnen uit soortkruising. *Zaadbelenen*, 4: 92–94.