

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***Estudio de la implicación de las hormonas en la formación de los óvulos de tomate: papel de las enzimas GA 2-oxidasas.***

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: ANDREA MARÍN LOZANO

TUTORES: ISABEL LÓPEZ DÍAZ Y ESTHER CARRERA BERGUA

COTUTOR ACADÉMICO: ISMAEL RODRIGO BRAVO

***Curso Académico: 2015-2016***

***VALENCIA, JULIO 2016***



**TÍTULO:** Estudio de la implicación de las hormonas en la formación de los óvulos de tomate: papel de las enzimas GA 2-oxidasas.

## **RESUMEN**

En plantas es importante entender los mecanismos que controlan el número de óvulos y su desarrollo, pues en última instancia, éstos determinan el número final de semillas y por tanto, el rendimiento de los cultivos. En las últimas décadas, las hormonas han sido identificadas como factores esenciales en el control de la formación de los óvulos, pues juegan un papel fundamental en la determinación del número final de éstos. Especialmente, hormonas como las auxinas, los brasinoesteroides o las citoquininas son consideradas muy importantes en este proceso, donde tienen un efecto positivo sobre el desarrollo de los óvulos. Sin embargo, aunque el papel de las giberelinas (GAs) sobre el desarrollo de los óvulos no ha sido todavía descrito, existen indicios de que estas hormonas son esenciales en este proceso, influyendo negativamente en el número final de óvulos, lo que se ha podido estudiar mediante el análisis de mutantes que presentan alteraciones en los niveles hormonales de GAs o en su respuesta. En este trabajo, se pretende afirmar el papel negativo de las GAs sobre el desarrollo de los óvulos en plantas de tomate, utilizando para ello las líneas transgénicas L1i y L5i, donde los genes GA2ox, codificadores de las enzimas inactivadoras de giberelinas GA 2-oxidasas, han sido silenciados. Para ello, se estudiaron las alteraciones fenotípicas en el número o la morfología de los ovarios, óvulos y semillas presentes en las líneas transgénicas L1i y L5i respecto a la línea control MT, así como las variaciones en los niveles de giberelinas y de otras hormonas (auxinas, ácido abscísico y ácido jasmónico). Los resultados de estos estudios muestran que el silenciamiento de los genes GA2ox da lugar a un aumento de los niveles de la giberelina bioactiva GA<sub>1</sub> y a una disminución de los productos inactivos GA<sub>51</sub>, GA<sub>34</sub>, GA<sub>29</sub> y GA<sub>8</sub> en los tejidos reproductivos de las líneas transgénicas de tomate, lo que era de esperar como resultado del silenciamiento de las enzimas inactivadoras GA 2-oxidasas. En cuanto a los niveles de auxinas, ácido abscísico y ácido jasmónico, no se observaron diferencias respecto al control, lo que sugiere que las GAs no influyen en el metabolismo de estas hormonas. Por otra parte, el estudio fenotípico reveló diferencias significativas sólo en la línea transgénica L5i, donde se observó que las variaciones en los niveles de GAs respecto al control MT, daban lugar a óvulos más pequeños, así como un número menor final de óvulos y de semillas por fruto. Este hecho, podría afirmar el papel negativo de las giberelinas sobre el desarrollo de los óvulos. En cuanto a la línea L1i, aunque se observaron variaciones en sus niveles de GAs respecto a MT, no mostró alteraciones fenotípicas, lo que podría ser debido a diferencias en la localización del transgén entre ambas líneas transgénicas.

**PALABRAS CLAVE:** tomate, hormonas, giberelinas, desarrollo de óvulos, GA 2-oxidasas.

**ALUMNO:** Andrea Marín Lozano

**TUTORES:** Isabel López Díaz y Esther Carrera Bergua

**COTUTOR ACADÉMICO:** Ismael Rodrigo Bravo

**LOCALIDAD Y FECHA:** Valencia, Julio 2016

**TITLE:** Hormone involvement in tomato ovule formation: role of GA 2-oxidase enzymes.

**ABSTRACT**

In plants it is important to understand the mechanisms that control the number of ovules and their development, because ultimately they determine the final number of seeds and thus the crop yield. Over recent decades, hormones have been identified as essential factors in ovule formation, as they play a key role in determining their final number. Especially, hormones such as auxins, brassinosteroids or cytokinins are considered very important in this process, where they have a positive effect on the ovule development. However, although the role of gibberellins (GAs) on the ovule development has not yet been described, there are indications that these hormones are essential in this process, having a negative effect on the final number of ovules, what has been studied by analyzing mutants that have changes in hormone levels of GAs or in its response. In this study, it is intended to affirm the negative role of GAs on the ovule development in tomato plants, using the transgenic lines L1i and L5i, where GA2ox genes, which encode gibberellin inactivating enzymes GA 2-oxidases, have been silenced. To do this, the phenotypic alterations in the number or morphology of the ovules, seeds and ovaries between transgenic lines, L1i and L5i, and the control MT were studied, as well as variations in the levels of gibberellins and other hormones (auxins, abscisic acid and jasmonic acid). The results of these studies show that silencing GA2ox genes leads to increased levels of bioactive gibberellin GA1 and decreased inactive products GA51, GA34, GA29 and GA8 in reproductive tissues of transgenic tomato lines, which was expected as a result of silencing GA 2-oxidases. Regarding the levels of auxins, abscisic acid and jasmonic acid, there were no differences relative to the control, suggesting that GAs do not influence the metabolism of these hormones. Moreover, the phenotypic study revealed significant differences only in the transgenic line L5i, where it was observed that variations in the levels of GAs resulted in smaller ovules, as well as a fewer number of ovules and seeds per fruit. This fact could confirm the negative role of gibberellins on the ovule number and its development. Concerning the L1i line, although variations in their levels of GAs were observed relative to MT, it did not show phenotypic alterations, which could be due to differences between the two transgenic lines in localization of the transgene.

**KEYWORDS:** tomato, hormones, gibberellins, ovule development, GA 2-oxidases.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, y como no podría ser de otra manera, a mis tutoras del laboratorio por la oportunidad que me han dado de llevar a cabo este trabajo, sobre todo a Isabel, por su gran apoyo y dedicación. Gracias por ayudarme en todo momento y por vuestra disponibilidad total para que todo saliese a la perfección. No tengo más que palabras de agradecimiento hacia vosotras.

A mis compañeros, mis limones, por haberme regalado grandes momentos durante estos cuatro años.

Pero sobre todo a mi familia, por su apoyo incondicional y por haber confiado siempre en mí.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>7</b>
3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	7
3.2. Caracterización fenotípica.....	8
3.2.1. Estudio de la inhibición de la ramificación en las líneas transgénicas.....	8
3.2.2. Estudio de alteraciones fenotípicas de los ovarios y óvulos.....	9
3.3. Cuantificación de hormonas.....	11
3.4. Análisis estadístico de los datos.....	12
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>13</b>
4.1. Caracterización fenotípica.....	13
4.2.1. Estudio de la inhibición de la ramificación en las líneas transgénicas.....	13
4.2.2. Estudio de alteraciones fenotípicas de los ovarios y óvulos.....	15
4.2. Cuantificación de hormonas.....	20
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>28</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>29</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de las líneas transgénicas utilizadas en este proyecto, L1i y L5i, y la línea control MT.....	<b>7</b>
---	----------

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ruta de biosíntesis de giberelinas.....	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Ejemplo de axila ramificada y no ramificada.....	<b>8</b>
<b>Figura 3.</b> Flores en antesis de las distintas líneas de tomate estudiadas.....	<b>9</b>
<b>Figura 4.</b> Ejemplos de frutos maduros de las distintas líneas de tomate estudiadas.....	<b>10</b>
<b>Figura 5.</b> Distintos estadios de flores en preantesis de plantas de la línea control MT.....	<b>11</b>
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de ramificación por axila de las distintas líneas transgénicas L1i y L5i y de la línea control MT en los lotes 1 y 2.....	<b>13</b>
<b>Figura 7.</b> Número de ramas por planta de la línea control MT y las líneas transgénicas L1i y L5i en los lotes 1 y 2.....	<b>14</b>
<b>Figura 8.</b> Representación de la evolución del patrón de ramificación a lo largo del tiempo en las líneas transgénicas L1i y L5i en comparación con la línea control MT.....	<b>14</b>
<b>Figura 9.</b> Fotografías obtenidas con el microscopio electrónico Leica DM5000 de cortes trasversales de ovarios de L1i, L5i y MT.....	<b>15</b>
<b>Figura 10.</b> Resultados de la caracterización fenotípica de los ovarios y óvulos de plantas de las líneas L1i y L5i y el control MT (Lote 1) .....	<b>16</b>
<b>Figura 11.</b> Resultados de la caracterización fenotípica de los ovarios y óvulos de plantas de las líneas L1i y L5i y el control MT (Lote 2) .....	<b>17</b>
<b>Figura 12.</b> Resultados de la determinación del número de semillas por fruto en cada una de las líneas transgénicas, L1i y L5i, y en la línea control MT.....	<b>18</b>
<b>Figura 13.</b> Resultados de la determinación del peso de los frutos y las semillas de cada línea.....	<b>19</b>
<b>Figura 14.</b> Resultados de la cuantificación de las distintas GAs presentes en la ruta de biosíntesis de esta hormona en plantas control MT.....	<b>21</b>
<b>Figura 15.</b> Incremento de los niveles de la giberelina bioactiva GA <sub>1</sub> y de su producto de inactivación, GA <sub>8</sub> , a lo largo de los distintos estadios del desarrollo de la flor.....	<b>22</b>
<b>Figura 16.</b> Resultados de la cuantificación de ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y auxinas (IAA) en los diferentes estadios del desarrollo de flores de plantas control MT.....	<b>22</b>
<b>Figura 17.</b> Resultados de la cuantificación de las giberelinas precursoras de GA <sub>1</sub> y en los primeros estadios del desarrollo de las flores de L1i, L5i y MT.....	<b>23</b>

<b>Figura 18.</b> Resultados de la cuantificación de las giberelinas precursoras de GA <sub>4</sub> y en los primeros estadios del desarrollo de las flores de L1i, L5i y MT.....	<b>24</b>
<b>Figura 19.</b> Resultados de la cuantificación de las giberelinas bioactivas GA <sub>1</sub> y GA <sub>4</sub> en los primeros estadios del desarrollo de las flores de L1i, L5i y MT.....	<b>24</b>
<b>Figura 20.</b> Resultados de la cuantificación de las giberelinas inactivas GA <sub>8</sub> , GA <sub>34</sub> , GA <sub>29</sub> y GA <sub>51</sub> en los primeros estadios del desarrollo de las flores de L1i, L5i y MT.....	<b>25</b>
<b>Figura 21.</b> Resultados de la cuantificación de ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y auxinas (IAA) en los primeros estadios del desarrollo de las flores de L1i, L5i y MT.....	<b>26</b>

# 1. Introducción.

El desarrollo normal de una planta depende de la interacción de factores externos, como la luz, el agua o la temperatura, e internos, como las hormonas. Las hormonas vegetales, denominadas fitohormonas, juegan un papel crucial en el ciclo vital y en las funciones de las plantas, controlando su crecimiento y desarrollo. Existen hormonas que activan los procesos de crecimiento y floración, otras retardan la caída de la hoja, hacen germinar las semillas o inducen la formación de flores, e incluso algunas facilitan la maduración de los frutos.

En los espermatófitos, tras la fertilización, los óvulos dan lugar a las semillas. Por ello, es esencial entender los mecanismos que controlan el número de óvulos y su desarrollo, ya que en última instancia, determinan el número final de semillas y, por tanto, el rendimiento de los cultivos (Cucinotta *et al.*, 2014).

*Arabidopsis thaliana* es una pequeña planta considerada como modelo para el estudio de muchos aspectos de la biología de las plantas. En las últimas décadas, se han identificado algunos factores involucrados en el desarrollo y crecimiento de las plantas, como las hormonas. Especialmente estas sustancias están muy estudiadas en *Arabidopsis*, donde son consideradas agentes esenciales en el control de la formación del óvulo, al jugar un papel fundamental en la determinación del número final de éstos. Esto se debe a que ciertas hormonas son importantes en la regulación del primordio ovular, el cual proviene de divisiones del tejido subepidermal de la placenta, dando lugar al óvulo (Reyes-Olalde *et al.*, 2013).

En primer lugar, una de las hormonas conocidas por su importancia en el desarrollo de los óvulos es la auxina. La hipótesis del gradiente de auxinas apoya el hecho de que altos niveles de auxinas en las regiones apicales del gineceo controlan la formación del estigma y del estilo, un nivel medio dirige la formación del óvulo, mientras que niveles bajos de la hormona son responsables del desarrollo del ginóforo en la base del gineceo (Nemhauser *et al.*, 2000). En todos los mutantes en los que la producción de auxinas disminuye o se detiene, los defectos severos en la formación del gineceo conducen a un pistilo con una reducción o una ausencia total de óvulos y la consiguiente esterilidad completa (Cucinotta *et al.*, 2014).

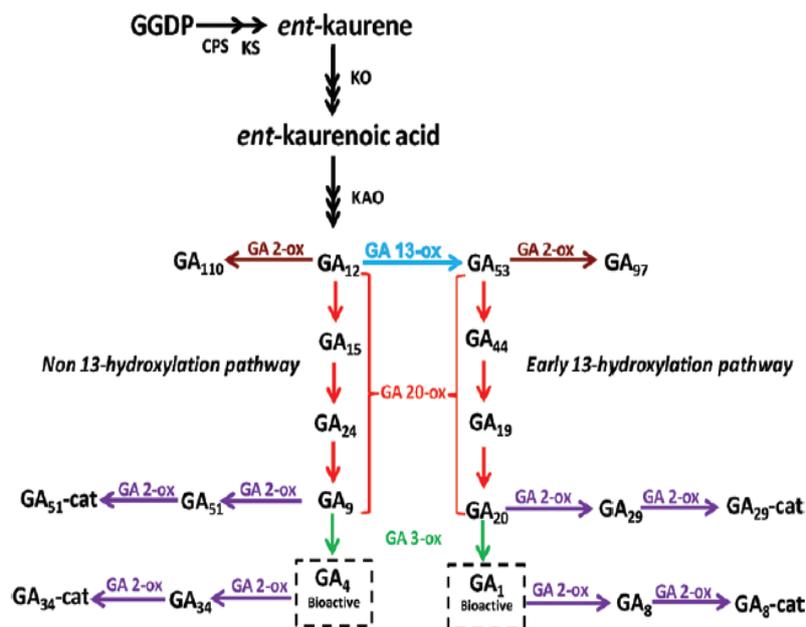
Por otra parte, las citoquininas tienen un papel esencial en la regulación de la división y diferenciación celular y también son importantes durante el desarrollo de los óvulos. Se ha demostrado que en plantas en las que se tiene un defecto en la producción o percepción de esta hormona, la formación correcta de los óvulos se compromete, y además se puede ver reducido drásticamente el número de óvulos. Las plantas con un incremento del nivel de citoquininas producen más flores y más grandes, y además, tienen un mayor número de óvulos, indicando un incremento de la actividad del tejido de la placenta (Cucinotta *et al.*, 2014).

Sin embargo, no solo son importantes estas dos hormonas, ya que se ha demostrado que los brasinoesteroides también juegan un papel crucial en la formación del óvulo y la semilla, regulando la expresión de genes que controlan el desarrollo de los óvulos, al estar involucrados en el control de la iniciación y formación de los órganos reproductivos. Plantas deficientes o insensibles a esta hormona, presentan menos semillas y más pequeñas, mientras que los que tienen niveles más altos de brasinoesteroides presentan más semillas. Además, recientes análisis han confirmado que estas hormonas regulan positivamente el número de óvulos (Huang *et al.*, 2012).

Concretamente, además de conocerse el papel de estas tres hormonas de forma individual, se sabe que su interacción es importante en la regulación de la iniciación del primordio ovular. No obstante, aunque el papel de las giberelinas (GAs) aún no ha sido claramente establecido, hay indicios de que estas hormonas también son esenciales en el desarrollo y crecimiento de los óvulos, influyendo negativamente en el número final de éstos, lo que se ha podido estudiar mediante el análisis de mutantes que presentan alteraciones en los niveles hormonales de GAs o en su respuesta.

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas que regulan una amplia gama de procesos de desarrollo en las plantas, tales como la germinación, el alargamiento del tallo, la expansión de las hojas, la floración y el desarrollo del fruto (Yamaguchi, 2008; Mutasa-Göttgens y Hedden, 2009; Seymour *et al.*, 2013). Además, influyen en el desarrollo de algunos órganos florales como las anteras (Olszewski *et al.*, 2002). Sin embargo, su papel en el desarrollo y crecimiento de los óvulos todavía no ha sido descrito, por lo que en este trabajo se pretende estudiar la implicación de estas hormonas en la formación de los óvulos, que en nuestro caso, se analizará en plantas de tomate.

La biosíntesis de esta hormona (**Figura 1**) comienza con difosfato de geranil-geraniol (GGDP) que se convierte en *ent*-kaureno por la acción de dos enzimas: CPS (*ent*-copalyl difosfato sintasa) y KS (*ent*-kaureno sintasa). El *ent*-kaureno se convierte después en GA<sub>12</sub>, la primera GA de la vía, por la acción de dos enzimas P450 asociadas a la membrana (monooxigenasas del citocromo P450): *ent*-kaureno oxidasa (KO) y ácido *ent*-kaurenoico oxidasa (KAO). A partir de este paso, hay dos vías paralelas: la vía de no-13-hidroxilación (que conduce a GA<sub>4</sub> activa) y la vía de 13-hidroxilación (que conduce a GA<sub>1</sub> activa), que dependen de la acción de la enzima citocromo P450, la GA 13-oxidasa (GA13ox) (Magome *et al.*, 2013). Las enzimas que catalizan las últimas etapas de la vía de biosíntesis de GAs son las GA 20-oxidasa (GA20ox) y las GA 3-oxidasa (GA3ox) (Yamaguchi, 2008; Hedden y Thomas, 2012). De este modo, la ruta de síntesis de esta hormona se divide en tres etapas: la síntesis de *ent*-kaureno, la conversión de *ent*-kaureno en GA<sub>12</sub> y la síntesis de GAs con 19 carbonos o 20. El uso en esta última etapa de la no-13-hidroxilación o de la 13-hidroxilación depende del tejido y de la especie (Yamaguchi, 2008; Magome *et al.*, 2013), siendo la 13-hidroxilación la más utilizada en tomate (Serrani *et al.*, 2007a).



**Figura 1.** Ruta de biosíntesis de giberelinas. Tomada de Martínez-Bello *et al.* 2015.

La vía metabólica de las giberelinas está estrechamente controlada con el fin de mantener los niveles hormonales adecuados que son necesarios para la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta. Los niveles endógenos de GAs se regulan, principalmente, por la biosíntesis y la inactivación (Martínez-Bello *et al.*, 2015). Se han identificado varios mecanismos de inactivación de giberelinas, siendo la más prevalente la 2 $\beta$ -hidroxilación, que consiste en la adición de un grupo hidroxilo (-OH) en el C-2 de la estructura de las giberelinas, provocando la pérdida irreversible de su actividad biológica. Las enzimas responsables de esta actividad son las GA 2-oxidasas (Thomas *et al.*, 1999; Rieu *et al.*, 2008; Hedden y Thomas, 2012), enzimas de tipo 2ODD que se pueden dividir en dos grupos principales de acuerdo con su especificidad por el sustrato: un grupo actúa sobre las GAs con 19 carbonos (C19-GA2oxs), que incluyen las GAs bioactivas, GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub>, y sus precursores inmediatos GA<sub>20</sub> y GA<sub>9</sub>, transformándolos en los productos inactivos GA<sub>8</sub>, GA<sub>34</sub>, GA<sub>29</sub> y GA<sub>51</sub>; mientras que el otro grupo actúa sobre las GAs con 20 carbonos (C20-GA2oxs), que incluyen a la GA<sub>12</sub> y la GA<sub>53</sub>, las cuales son transformadas en sus productos inactivos GA<sub>110</sub> y GA<sub>97</sub> respectivamente (Serrani *et al.*, 2007a; Hedden y Thomas, 2012; Lee y Zeevaart, 2005).

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*), planta utilizada para llevar a cabo este trabajo, es uno de los cultivos más importantes en todo el mundo. Ha sido ampliamente utilizado, no sólo como un alimento, sino también como una planta modelo debido a varias características de desarrollo que no se encuentran en otras plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*. Estas características son, por ejemplo, la ramificación de brotes simpodial o la formación de frutos climatéricos carnosos (Ranjan *et al.*, 2012). Además de estas propiedades, presenta otras características que hacen que esta planta represente un buen sistema experimental: un genoma completamente secuenciado (900 Mb), tiempo corto de generación, disponibilidad de protocolos de transformación y regeneración de alta eficiencia, así como mapas de ligamiento y colecciones ricas de germoplasmas (Pesaresi *et al.*, 2014).

Más específicamente, el cultivo Micro-Tom (MT) utilizado como control en este proyecto, ha sido propuesto como un modelo de sistema de tomate muy ventajoso debido a su pequeño tamaño, su rápido ciclo de vida (alrededor de 90 días desde la germinación hasta la maduración del fruto) y sus capacidades de alto rendimiento (Meissner *et al.*, 1997, Carvalho *et al.*, 2011). El fenotipo de esta variedad es el resultado de mutaciones puntuales en los genes *Dwarf* (D), *Self-pruning* (SP) e *Internode length reduction* (Ilr), pero no en la biosíntesis de GAs (Martí *et al.*, 2006). Por ello, este cultivo es un modelo apropiado para la investigación sobre la regulación hormonal en la producción y el desarrollo de frutos, ya que responde a giberelinas de la misma manera que otras variedades de tomate (Serrani *et al.*, 2007b).

En el tomate, las enzimas GA 2-oxidasas, encargadas de la transformación de las giberelinas activas y sus precursores inmediatos en sus productos inactivos, están codificadas por una pequeña familia multigénica de cinco miembros con un cierto grado de redundancia en tejidos vegetativos y reproductivos. En estudios anteriores, con el fin de investigar su papel en el tomate, se indujo el silenciamiento de los cinco genes en plantas transgénicas, obteniéndose las líneas L1i y L5i, utilizadas en este proyecto. Estas líneas transgénicas proceden del silenciamiento múltiple de todos los genes GA2ox presentes en MT, inducido mediante el uso de una construcción "*short-harpin RNA*" (shRNA). De este modo, se utilizó un fragmento quimérico compuesto de porciones idénticas a los genes GA2ox1, GA2ox3, y GA2ox4, y muy similares a GA2ox2 y GA2ox5 (más del 92% de identidad). Este fragmento se componía de una porción de 163 pb del GA2ox4, 188 pb de GA2ox1 y 123 pb de GA2ox3, las cuales se amplificaron por separado a partir de clones de cDNA, utilizando los cebadores específicos. Estos fragmentos se purificaron y se unieron mediante una PCR de solapamiento y el fragmento final, shRNA2ox, se clonó y se secuenció para confirmar que las secuencias eran correctas y habían sido bien ensambladas.

Para crear la construcción final utilizada para la transformación de plantas de tomate, el fragmento obtenido se recombinó en el vector binario pK7GWIWG2(II) para obtener el constructo final 35S::GA2ox/RNAi. Este vector llevaba el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico *Cauliflowerm* (CaMV) y el gen *nptII* para resistencia a la kanamicina (Martínez-Bello *et al.*, 2015).

Una vez obtenida la construcción, varios explantes de hojas de tomate de la línea MT fueron infectados con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, que llevaba la construcción short-hairpin 35S::GA2ox/RNAi, y se obtuvieron varias líneas homocigóticas, de las cuales sólo se eligieron L1i y L5i para llevar a cabo la caracterización. De este modo, se produjo el silenciamiento de los genes GA2ox, con el consecuente silenciamiento de las enzimas inactivadores de giberelinas resultantes GA 2-oxidasas, dando lugar a un incremento de los niveles de GAs activas en aquellos tejidos donde estas enzimas tienen un papel en su regulación (Martínez-Bello *et al.*, 2015).

Las plantas transgénicas obtenidas mostraron inducción de partenocarpia facultativa, una inhibición significativa en la aparición de las ramas laterales y también un aumento significativo en la concentración GA<sub>4</sub> en ovarios y yemas axilares en comparación con las plantas de tipo salvaje. Además, los ovarios transgénicos sin fertilizar eran mucho más grandes que los ovarios de tipo salvaje (aproximadamente 30 veces más). Esto sugiere que los genes GA2ox son importantes para la regulación de los niveles de giberelinas en los ovarios y las yemas axilares de plantas de tomate, desempeñando así un papel fundamental en la regulación de su desarrollo. Asimismo, su silenciamiento es responsable del crecimiento de frutos partenocárpicos y de la inhibición de la ramificación (Martínez-Bello *et al.*, 2015).

Además del estudio realizado con estas líneas, el papel de las giberelinas en las plantas de tomate se ha estudiado durante años mediante el uso de varias plantas modificadas genéticamente. En primer lugar, se caracterizaron plantas de tomate que sobreexpresaban la enzima GA 20-oxidasa, y por tanto, presentaban una mayor cantidad de giberelinas. Estas líneas transgénicas de tomate mostraron capacidad de crecimiento partenocárpico, inhibición de la ramificación y un aumento significativo en el rendimiento. El mayor rendimiento de estas líneas GA20ox-OE fue notable, sobre todo, porque se determinó un mayor número de frutos sin una consiguiente reducción del peso promedio del fruto, lo que se esperaría normalmente como resultado de un mayor número de frutos y por tanto, de una mayor competencia por los nutrientes. De este modo, aunque las plantas transgénicas tenían ligeramente un menor número de flores, su número total de frutos fue mayor y éstas tenían un peso fresco medio similar a las frutas de la planta control, lo que conduce a rendimientos globales más altos. (García-Hurtado *et al.*, 2012).

Por otra parte, se llevó a cabo la caracterización del mutante de tomate *procera* (*pro*), el cual presenta una mutación en el gen que codifica para la proteína SIDELLA, un represor de la vía de señalización de las giberelinas. Así, de acuerdo con la pérdida de función de esta proteína, estas plantas *pro* muestran un fenotipo de respuesta constitutiva a GAs, aunque los niveles de esta hormona se reducen. Entre otras cosas, esta planta presenta una fuerte capacidad partenocárpica asociada con un mayor crecimiento de los ovarios preantesis, induce la elongación del estilo evitando la autopolinización y presenta una inhibición significativa de las ramificaciones laterales. Además, *pro* presenta menos flores por planta, aunque el número total de frutos desarrollados es casi el doble, pero más pequeños (Carrera *et al.*, 2012).

Asimismo, existen otras pruebas que apoyan la afirmación de que el desarrollo del fruto en el tomate depende de la señalización de GAs y que estas hormonas tienen un papel positivo en el proceso de fructificación: (i) la aplicación de GAs en ovarios no polinizados induce el crecimiento de frutos partenocárpicos (Fos *et al.*, 2000); (ii) el contenido de GAs aumenta en el ovario tras la polinización (Bohner *et al.*, 1988; Koshioka *et al.*, 1994); (iii) la aplicación de inhibidores de la biosíntesis de GAs impide el desarrollo de los frutos de ovarios polinizados, y este efecto se invierte mediante la aplicación de GAs (Sjut y Bangerth, 1982/83); y (iv) el silenciamiento postranscripcional antisentido del gen *SIDELLA*, un represor nuclear cuya acción se suprime por GAs (Schwechheimer, 2008), induce la producción de frutos partenocárpicos.

En conclusión, el papel de las GAs sobre el desarrollo del ovario y el fruto en plantas de tomate ha sido determinado mediante el estudio de varias líneas transgénicas, pero la función de estas hormonas sobre la iniciación y desarrollo de los óvulos no ha sido todavía descrito. Sin embargo, estudios no publicados acerca de la implicación de las giberelinas en el desarrollo de los óvulos realizados en los dos mutantes comentados anteriormente (*GA20ox-OE* y *procera*), indican que altos niveles de GAs o una respuesta constitutiva a estas hormonas, causa una disminución en el número de óvulos en tomate, y por consiguiente, un menor número de semillas por fruto. Además, estas líneas poseen otras características presentes también en las líneas transgénicas utilizadas en este proyecto (L1i y L5i), como la capacidad partenocárpica o la inhibición de la ramificación. Por lo tanto, al observarse tales características en común, se quiere analizar si nuestras líneas transgénicas presentan también una inhibición en el desarrollo de los óvulos, pues al caracterizarse por un mayor contenido de GAs en tejidos reproductivos, se espera que nuestros mutantes muestren también un número menor de óvulos en comparación con la línea control MT, así como un menor número de semillas por fruto.

## 2. Objetivos.

En este proyecto se pretende estudiar el papel de las giberelinas, especialmente de los genes que codifican las enzimas inactivadoras de giberelinas (GA2ox), en la iniciación y el desarrollo de los óvulos. Para ello, se utilizarán plantas transgénicas de tomate donde estos genes han sido silenciados para estudiar:

1. Posibles alteraciones fenotípicas en el número o morfología de los ovarios, óvulos y semillas.
2. Efecto de las mutaciones sobre los niveles de giberelinas en las fases en que los óvulos se están desarrollando.
3. Estudio de las posibles interacciones entre GAs y otras hormonas que puedan estar implicadas en el desarrollo de los óvulos.

Para ello, en primer lugar se estudiarán alteraciones fenotípicas ya descritas en las líneas transgénicas, como la inhibición de la ramificación, para comprobar el buen estado de éstas y asegurar el funcionamiento de la construcción que induce el silenciamiento de los genes GA2ox.

En segundo lugar, las alteraciones fenotípicas en el desarrollo de los óvulos se estudiarán mediante el análisis comparativo del número y la morfología de los óvulos y los ovarios en los mutantes de RNA de interferencia (GA2ox-RNAi) L1i y L5i, y la línea isogénica control MT, mediante el conteo directo de óvulos por ovario, utilizando cortes frescos de flores de cada línea. Además, se llevará a cabo un conteo indirecto de óvulos por ovario a través de la determinación del número de semillas por fruto de cada línea, a fin de analizar posibles diferencias entre los mutantes y el control.

Por último, se realizarán cuantificaciones hormonales por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS), para determinar si las giberelinas estaban alteradas en ovarios y óvulos en desarrollo en las líneas transgénicas, y si esta alteración influye en el metabolismo de otras hormonas como auxinas, ácido abscísico o ácido jasmónico.

### 3. Materiales y métodos.

#### 3.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.

Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron plantas de Micro-Tom (MT) como línea isogénica control, debido a sus ventajosas características ya mencionadas, y las líneas transgénicas L1i y L5i, las cuales presentan los genes GA2ox silenciados con el consecuente silenciamiento de las enzimas inactivadores de giberelinas resultantes GA 2-oxidasas, dando lugar a un incremento de los niveles de GAs activas en aquellos tejidos donde estas enzimas tienen un papel en su regulación. Las características distintivas entre la línea control MT y las líneas transgénicas se encuentran en la **Tabla 1**.

Línea	Genotipo	Fenotipo	Fenotipo hormonal
Micro-Tom (MT)	d -	Ramificación abundante Desarrollo de frutos no partenocárpico	BR -
L1i y L5i	d - GA2ox - RNAi	Ramificación inhibida Inducción de partenocarpia facultativa	BR - GA + (en yemas axilares y frutos)

**Tabla 1.** Características de las líneas transgénicas utilizadas en este proyecto, L1i y L5i, y la línea control MT.

Para llevar a cabo el cultivo de las plantas necesarias para el estudio, en primer lugar, varias semillas de cada línea se plantaron en distintas placas Petri de 90 mm, las cuales contenían una disolución de agua y agar al 0,7%. Una vez dispersas las semillas por cada una de las placas, éstas se sellaron con Parafilm para evitar la evaporación y se dejaron crecer en una cámara de crecimiento (Fitotron) a  $26 \pm 0.5$  °C en oscuridad (tapadas con papel de aluminio), con el fin de ayudar a la germinación. Transcurridos aproximadamente dos días, las placas de destaparon y durante tres días más, estuvieron en la cámara de crecimiento en condiciones de luz/oscuridad.

Tras una semana, las plántulas de tomate de las distintas líneas desarrollaron la raíz y algunos cotiledones, y estaban listas para ser trasplantadas a macetas en el invernadero. Así, las plántulas seleccionadas se pasaron a macetas de 12 cm de diámetro (una plántula de cada línea por maceta), las cuales contenían una mezcla de turba y vermiculita (1:1 v/v) previamente humedecida. En total se plantaron 20 plantas tanto de L1i como de L5i y 30 plantas de MT (Lote 1). Las plantas se dispusieron de forma intercalada en la zona de riego, de modo que las condiciones ambientales fueran las mismas para las 3 líneas y así pudiéramos asegurarnos que los resultados se debían al silenciamiento de los genes y no a distintas condiciones, como la luz o la temperatura.

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

Un mes después se plantó otro lote de semillas (Lote 2) siguiendo el mismo método explicado, pero trasplantando en este caso dos plántulas de cada línea por maceta con un total de 30 plántulas, tanto de L1i como de L5i, y 40 plántulas de MT. Además de este, otro lote más fue plantado un mes y medio después de este último (Lote 3), con 15 plantas por línea en este caso.

## 3.2. Caracterización fenotípica.

### 3.2.1. Estudio de la inhibición de la ramificación en las líneas transgénicas.

Las líneas transgénicas utilizadas, L1i y L5i, presentan los genes codificadores de las enzimas inactivadoras de giberelinas GA 2-oxidasas silenciados, esperándose un aumento de las GAs activas GA<sub>4</sub> y GA<sub>1</sub> y una disminución de los productos inactivos (GA<sub>51</sub>, GA<sub>29</sub>, GA<sub>34</sub> y GA<sub>8</sub>) en aquellos tejidos en que estas enzimas son importantes.

El efecto del silenciamiento de estos genes ya había sido estudiado, sugiriendo que los genes GA2ox son importantes para la regulación de los niveles de giberelinas en los ovarios y las yemas axilares de plantas de tomate, al desempeñar un papel importante en la regulación de su desarrollo. Asimismo, su silenciamiento es responsable del crecimiento de frutos partenocárpicos y de la inhibición de la ramificación (Martínez-Bello *et al.*, 2015).

A fin de comprobar que las líneas transgénicas utilizadas en este proyecto, L1i y L5i, se encontraban en buen estado y todavía presentaban los genes silenciados, se llevó a cabo el estudio de la inhibición de las ramas laterales presente en estas líneas en comparación con la línea isogénica control MT. Para ello, se determinó el patrón de ramificación de las plantas transgénicas 35S::GA2ox/ARNi y las silvestres, midiendo el porcentaje de axilas ramificadas (% de ramificación =  $n^{\circ}$  de axilas ramificadas /  $n^{\circ}$  total de axilas  $\times 100$ ) y el número de ramas totales por planta (suma del número de axilas de una planta que presentan una ramificación). Eran consideradas axilas ramificadas aquellas axilas con una ramificación igual o mayor de 0,5 cm (Figura 2).



**Figura 2.** Ejemplo de axila ramificada y no ramificada. La imagen de la izquierda corresponde a una axila ramificada de la línea control MT y la imagen de la derecha pertenece a una axila sin ramificar de la línea transgénica L1i.

En el lote más nuevo (Lote 3) el patrón de ramificación se determinó en varios días, para ver la evolución de la ramificación y la aparición de nuevas ramas en las líneas transgénicas en comparación con el control MT. Por otra parte, en los dos lotes más antiguos (Lote 1 y Lote 2) este patrón sólo fue analizado un día, pues las plantas ya estaban más crecidas y las axilas ya habían ramificado.

### 3.2.2. Estudio de alteraciones fenotípicas de los ovarios y óvulos.

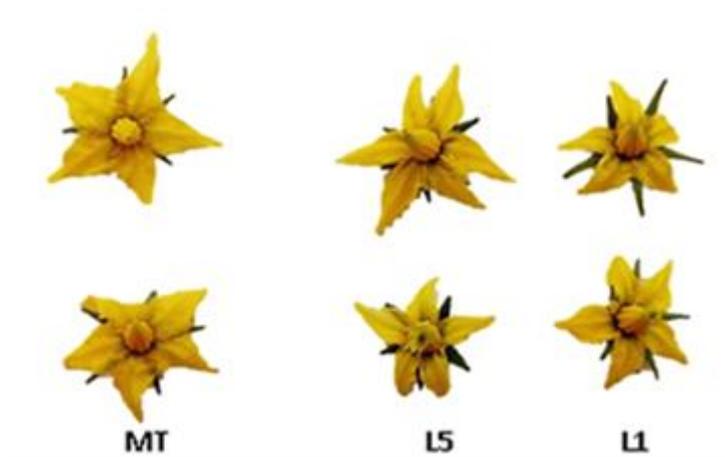
Para llevar a cabo la caracterización fenotípica y el estudio del número y la morfología de los ovarios y óvulos de las líneas transgénicas L1i y L5i y la línea isogénica control MT, se realizaron cortes en fresco con un vibratomo. Además del conteo directo de óvulos por ovario realizado con los cortes obtenidos, se realizó un conteo indirecto mediante la determinación del número de semillas por tomate.

El vibratomo es un dispositivo utilizado para preparar cortes en fresco, cortando los tejidos con una cuchilla de acero vibradora que produce cortes de un grosor uniforme. El movimiento de aserrado de la cuchilla facilita el corte de tejidos extremadamente blandos o, a la inversa, muy resistentes. La amplitud de la vibración lateral, la velocidad de avance, y el ángulo de la cuchilla determinan la calidad del corte.

El mecanismo de corte consiste en una plataforma, sobre la que se sitúa la muestra, y de una cuchilla de borde muy afilado que se desplaza horizontalmente sobre la muestra realizando el corte, pudiendo regularse en altura para poder seleccionar el grosor del corte. La característica principal del vibratomo es que la cuchilla, además de avanzar sobre la muestra, posee un movimiento de vibración lateral a modo de sierra que facilita el corte y evita arrastrar el tejido. La muestra se encuentra adherida, mediante pegamento de contacto, directamente a un bloque portamuestras que se coloca sobre una plataforma.

Otra característica del vibratomo es que todo el proceso de corte se realiza bajo una solución acuosa que normalmente es una solución tamponada o una solución salina. Para ello, tanto la muestra como el borde de corte de la cuchilla han de estar sumergidos, de modo que los cortes que se obtienen se denominan cortes en flotación, pues no están sujetos a ningún soporte. Así, los cortes se recuperan de la solución con un pincel y se montan posteriormente sobre un portaobjetos para su observación con el microscopio óptico.

De este modo, para llevar a cabo este apartado, se recogieron al azar 13 flores en antesis de las plantas cultivadas en el invernadero del Lote 1, tanto de las líneas transgénicas L1i y L5i como del control MT (**Figura 3**), manteniéndolas húmedas utilizando una placa Petri con papel mojado. Al igual que con el Lote 1, se recogieron otras 13 flores en antesis por línea del Lote 2, para realizar el estudio por duplicado utilizando distintos lotes de plantas. Era importante que el estadio de la flor fuera el mismo en todas las líneas, para así poder realizar una correcta comparación entre ellas.



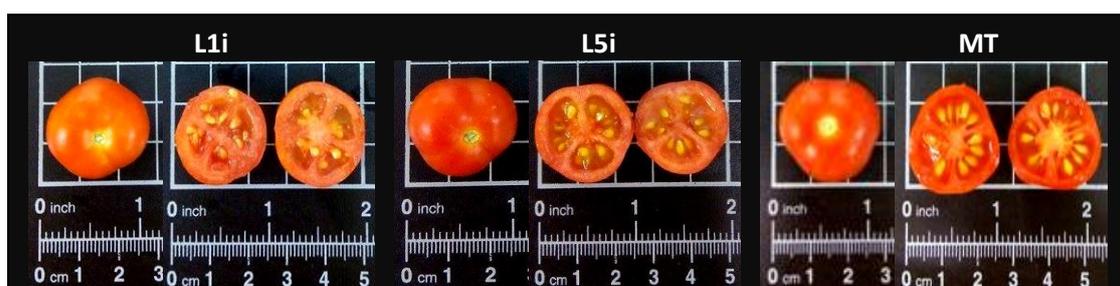
**Figura 3.** Flores en antesis de las distintas líneas de tomate estudiadas.

Una vez en el laboratorio, se diseccionaron las flores cuidadosamente para eliminar los pétalos, sépalos y estambres. Este paso se realiza rápidamente para evitar la deshidratación y el desgarro de los tejidos, que induce a su oxidación. A continuación, se realizó la inclusión de los ovarios en bloques de agar. Para ello, se preparó una solución de agar al 50% calentando en el microondas y, seguidamente, se sumergió en un baño calentado a 80 °C previamente para mantenerlo líquido. En el momento de la inclusión, se llenaron varios pocillos de una Microplaca de 96 pocillos con el agar líquido y rápidamente, antes de que solidificara, se sumergió cada ovario en posición vertical en cada pocillo. Cuando el agar estuvo sólido, se sacaron los bloques conteniendo el ovario y se prepararon para realizar los cortes.

A continuación, usando un vibratomo Campden, se cortaron secciones de las muestras de 20 µm. Los cortes obtenidos se tiñeron con azul de toluidina al 0,001% (para visualizar mejor los óvulos) y se montaron en un portaobjetos, añadiendo una gota de agua destilada a la muestra y cubriéndola con un cubreobjetos. Por último, los cortes se observaron al microscopio óptico (Leica DM5000 o Nikon Eclipse E600) y seleccionando aquellos que presentaban una sección de corte del ovario más grande, se fotografiaron para su posterior análisis.

Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa de dominio público ImageJ, calculando el diámetro y el área de cada uno de los ovarios de los cortes seleccionados (sólo un corte por ovario) y de diez de sus óvulos y determinando el número de óvulos y lóbulos por ovario de cada línea, con el fin de identificar posibles diferencias entre los mutantes L1i y L5i y la línea control MT.

Por otra parte, se llevó a cabo la determinación del número de semillas por fruto, una vez estos estuvieron maduros, para analizar el efecto de las GAs sobre el número final de semillas. Para ello, se fueron cogiendo tomates de cada línea del Lote 1 (**Figura 4**) una vez éstos se iban poniendo maduros, recolectando al final un total de 22 tomates de la línea L1i, 31 de L5i y 57 de MT. Los tomates recogidos se pesaban y se partían por la mitad para contar el número de semillas, y una vez finalizado el conteo, las semillas se dejaban durante 30 minutos en una disolución de lejía al 30% para su desinfección. Pasado ese tiempo, las semillas se dejaban secar y se guardaban en un tubo Falcon para su uso en estudios futuros.



**Figura 4.** Ejemplos de frutos maduros de las distintas líneas de tomate estudiadas. Estos frutos fueron utilizados para el estudio del efecto del silenciamiento de los genes *GA2ox* sobre el número final de semillas por fruto.

### 3.3. Cuantificación de hormonas.

El estudio del efecto del silenciamiento de los genes que codifican las enzimas inactivadoras de giberelinas (GA 2-oxidasas) sobre los niveles de las formas bioactivas de las giberelinas, se llevó a cabo mediante la cuantificación de giberelinas por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS). De este modo, se pretendía determinar si los niveles de giberelinas estaban alterados en las distintas fases de flores en desarrollo de las líneas transgénicas L1i y L5i respecto a la línea isogénica MT, y comprobar si esta alteración influía en el metabolismo de otras hormonas como auxinas (IAAs), ácido abscísico (ABA) o ácido jasmónico (JA).

Para ello, en primer lugar se recogieron flores de distintos tamaños en preantesis (del estadio 1 al 5) de la línea control MT (**Figura 5**), para estudiar los niveles de giberelinas y de otras hormonas durante el crecimiento de las flores hasta alcanzar la antesis, lo que nos ayudaría a entender mejor los resultados obtenidos en el estudio comparativo con las líneas transgénicas. Las flores para llevar a cabo este experimento se recogieron del Lote 1 del invernadero y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido antes de ser almacenadas a -80 °C hasta su análisis. En total, se recolectaron 5 muestras de entre 30 y 60 mg de flores de los tres primeros estadios, 4 muestras de 70 mg del estadio 4 y 3 muestras de unos 100 mg del estadio 5.



**Figura 5.** Distintos estadios de flores en preantesis de plantas de la línea control MT.

Por otra parte, en segundo lugar se recogieron flores en preantesis (estadio 1 y 2) de las plantas L1i, L5i y MT del invernadero, siguiendo el mismo método mencionado anteriormente, para realizar el estudio comparativo entre las líneas transgénicas y el control y analizar las diferencias en sus niveles hormonales. Las flores recogidas debían ser de estadios tempranos, antes del proceso de antesis, pues se pretendía estudiar el efecto de las giberelinas desde las etapas tempranas del desarrollo de los ovarios y óvulos. En este caso, las flores recogidas fueron del Lote 2, y se recolectaron 10 muestras de cada línea del estadio 1 y 9 muestras del estadio 2, conteniendo cada una entre 30 y 70 mg de flores.

Las flores en preantesis recogidas, tanto del Lote 1 como del Lote 2, se trituraron con ayuda de nitrógeno líquido utilizando un mortero hasta conseguir una muestra homogeneizada de tejido fresco. En un tubo Eppendorf de 2 mL, se añadió a cada muestra triturada 1 mL de 80% metanol-1% ácido acético-H<sub>2</sub>O (disolvente) y los compuestos deuterados (estándares internos) de las distintas hormonas, que en nuestro caso eran GAs, IAAs, ABA y JA. A continuación, se dejó extraer en agitación en una sala a 4 °C durante una hora y después se centrifugó a 14000 g durante 4 minutos a baja temperatura. Tras la centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se re-extrajo el pellet utilizando el mismo volumen de disolvente fresco durante 15 minutos, también a 4 °C. Pasado ese tiempo, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se recuperó el sobrenadante, agrupándolo con el obtenido en el paso anterior en un nuevo Eppendorf y dejándolo toda la noche a -20 °C para la precipitación de proteínas y restos residuales.

Al día siguiente, se centrifugó a 14000 *g* durante 4 minutos a baja temperatura y se pasó el sobrenadante a un tubo de vidrio. El metanol se eliminó en un evaporador rotatorio (sistema speed-vac, Thermo Scientific) sin temperatura durante aproximadamente dos horas y media, hasta obtener un extracto acuoso de una cantidad inferior a 400  $\mu$ l, el cual se llevó hasta 1 mL con 1% ácido acético en H<sub>2</sub>O.

Una vez extraídas las hormonas, se llevó a cabo la purificación utilizando columnas Oasis HLB (fase reversa). Para ello, en primer lugar se equilibraron las columnas lavando primero con 1 mL de acetonitrilo y después con 1 mL de metanol. A continuación, se pasó por las columnas un 1 mL del disolvente inicial, que en nuestro caso era 1% ácido acético en H<sub>2</sub>O, y se aplicó el extracto acuoso donde se encontraba nuestra muestra. Una vez pasada, se lavaron con 1 mL del disolvente inicial, para eliminar sales y compuestos muy polares, y se eluyeron las hormonas mediante 95 % metanol- 1% ácido acético- H<sub>2</sub>O. Los eluidos obtenidos se llevaron a sequedad usando el speed-vac hasta que estuvo completamente seco y el residuo derivado se disolvió en 5 % ácido acético- 1% acetonitrilo- H<sub>2</sub>O.

El proceso de purificación continuó utilizando columnas Oasis MCX (intercambio catiónico), que primero se lavaron con 1 mL de acetonitrilo y 1 mL de metanol y después se regeneraron con 0,5 mL de cloruro de hidrógeno al 0,1 M. Después, se pasó 1 mL de disolvente inicial (1% de ácido acético en H<sub>2</sub>O), se aplicó el extracto acuoso y se volvió a lavar con el disolvente inicial. La elución de las hormonas ácidas y neutras que quedaron retenidas en la columna se llevó a cabo utilizando metanol al 100%, y el eluido se eliminó en el rotavapor hasta obtener un residuo seco a partir del cual se pudo cuantificar el contenido de GAs, IAA, ABA y JA. Los residuos secos obtenidos se disolvieron en 100  $\mu$ L de 5% acetonitrilo- 1% ácido acético- H<sub>2</sub>O y se pasaron a viales de rosca de 2 mL.

Cuando todas las muestras estuvieron purificadas, las hormonas fueron analizadas con un espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo líquido UHPLC (*Ultra HighPerformance Liquid Chromatography*) y un inyector automático AS (*autosampler*). El espectrómetro de masas utilizado fue un equipo Q-exactive (ThermoFisher Scientific), con un analizador Orbitrap de alta resolución y exactitud de masa. A continuación, las concentraciones de GAs y del resto de hormonas en los extractos se determinaron utilizando curvas de calibración de cada hormona incorporadas en el análisis, y los programas Xcalibur 2.2. y TraceFinder (Thermo Scientific) fueron usados para controlar el instrumento y para adquirir y procesar todos los datos obtenidos.

### **3.4. Análisis estadístico de los datos.**

Los datos obtenidos, tanto las concentraciones obtenidas en la cuantificación de hormonas como los datos conseguidos de los cortes de ovarios y del conteo de semillas, fueron examinados estadísticamente mediante un test-T (prueba t-Student), utilizando la aplicación GraphPad QuickCalcs (disponible *online* en <http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/>).

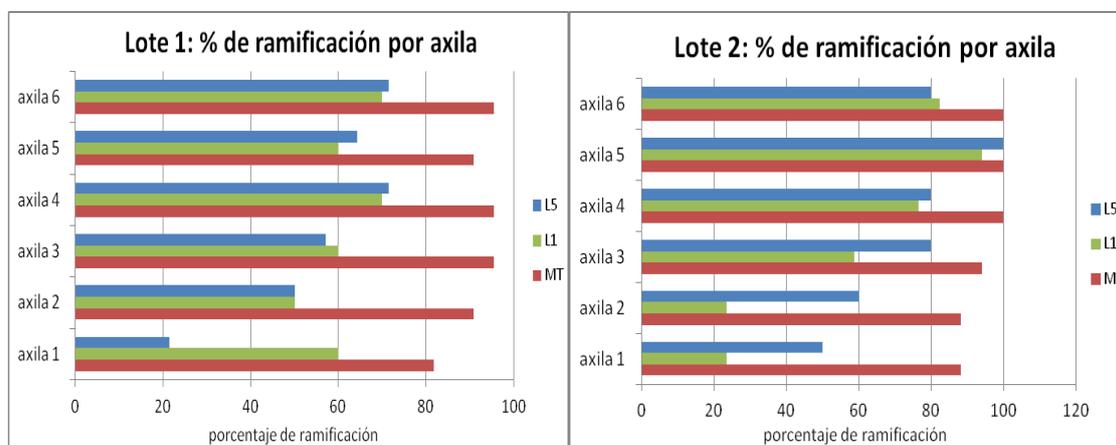
## 4. Resultados y discusión.

### 4.1. Caracterización fenotípica.

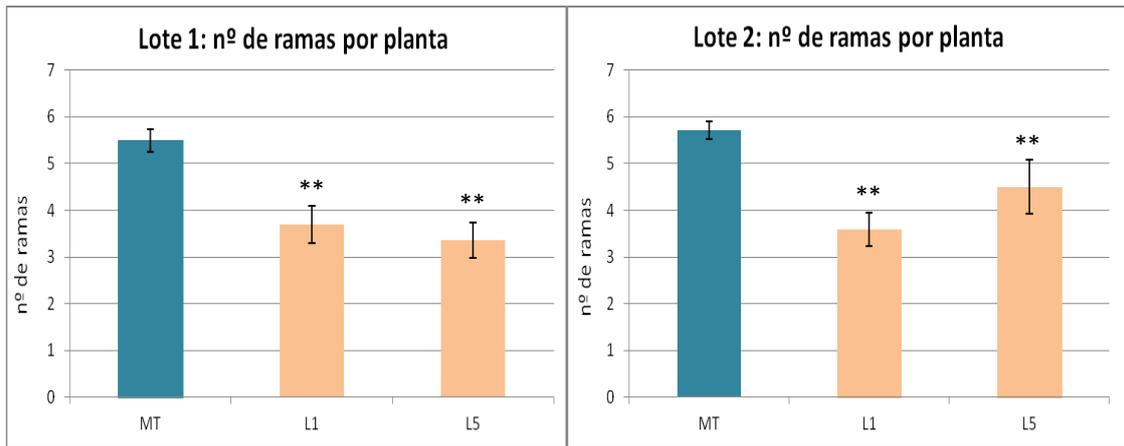
#### 4.2.1. Estudio de la inhibición de la ramificación en las líneas transgénicas.

Como ya se ha comentado, el silenciamiento en plantas de tomate de los genes codificadores de las enzimas inactivadoras de giberelinas GA 2-oxidasas, altera los niveles de esta hormona en aquellos tejidos en los que estas enzimas son importantes, produciendo entre otras cosas, la inhibición de la ramificación en aquellas líneas en que estos genes han sido silenciados (Martínez-Bello *et al.*, 2015). De este modo, para comprobar que las plantas transgénicas utilizadas en este proyecto mantenían el fenotipo y todavía presentaban los genes GA2ox silenciados, se llevó a cabo el estudio de la inhibición de las ramas laterales presente en las líneas L1i y L5i en comparación con la línea isogénica control MT.

Para ello, en primer lugar se estudió el patrón de ramificación de los dos lotes más antiguos, el Lote 1 y el Lote 2, midiendo el porcentaje de axilas ramificadas ( $\% \text{ de ramificación} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de axilas ramificadas}}{\text{n}^\circ \text{ total de axilas}} \times 100$ ) (**Figura 6**) y el número total de ramas por planta (suma del número de axilas de una planta que presentan una ramificación) (**Figura 7**). La edad de los lotes en el momento en el que se analizó este patrón era de 107 días y 79 días respectivamente. Por otra parte, el Lote 3, al ser el lote más joven, se utilizó para estudiar la evolución de la ramificación a lo largo del tiempo de las líneas L1i y L5i respecto al control MT. Así, el número de axilas ramificadas en este lote fue determinado en varios días, a una edad de las plantas de 36, 41, 43, 47 y 54 días (**Figura 8**).

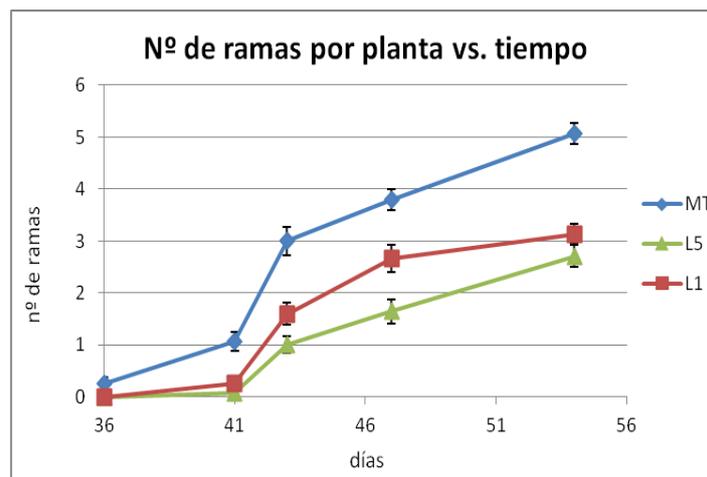


**Figura 6.** Porcentaje de ramificación por axila de las distintas líneas transgénicas L1i y L5i y de la línea control MT en los lotes 1 y 2.



**Figura 7.** Número de ramas por planta de la línea control MT y las líneas transgénicas L1i y L5i en los lotes 1 y 2. Los valores provienen del promedio del número de ramas de 22 plantas de MT, 10 de L1i y 14 de L5i en el Lote 1, y del promedio de 17 de MT, 17 de L1i y 10 de L5i en el Lote 2. Las diferencias estadísticamente significativas entre los valores de las líneas transgénicas y el control están indicados (\*, estadísticamente significativo; \*\*, extremadamente significativo estadísticamente) ( $p < 0,005$ ).

En la **Figura 6** se observa como el porcentaje de ramificación es mayor en las plantas de la línea control MT en comparación con las líneas transgénicas, siendo más notables las diferencias en las axilas inferiores de las plantas y reduciéndose en las axilas superiores, donde el porcentaje de ramificación de las distintas líneas está más igualado. Por otra parte, estos datos se confirman con el promedio del número de ramas totales por planta de las distintas líneas (**Figura 7**), siendo significativamente mayor en MT, como era de esperar si el fenotipo característico de las líneas transgénicas GA2ox-RNAi, la inhibición de la ramificación, se mantenía en nuestras líneas L1i y L5i. Estas diferencias en el número de ramas por planta es debida sobre todo a las diferencias observadas en las axilas inferiores, pues como se ha comentado anteriormente, en éstas el porcentaje de ramificación es considerablemente inferior en las líneas L1i y L5i.



**Figura 8.** Representación de la evolución del patrón de ramificación a lo largo del tiempo en las líneas transgénicas L1i y L5i en comparación con la línea control MT. Los valores provienen del promedio del número de ramas por planta de cada línea, medido en distintos días, a una edad de las plantas de 36, 41, 43, 47 y 54 días.

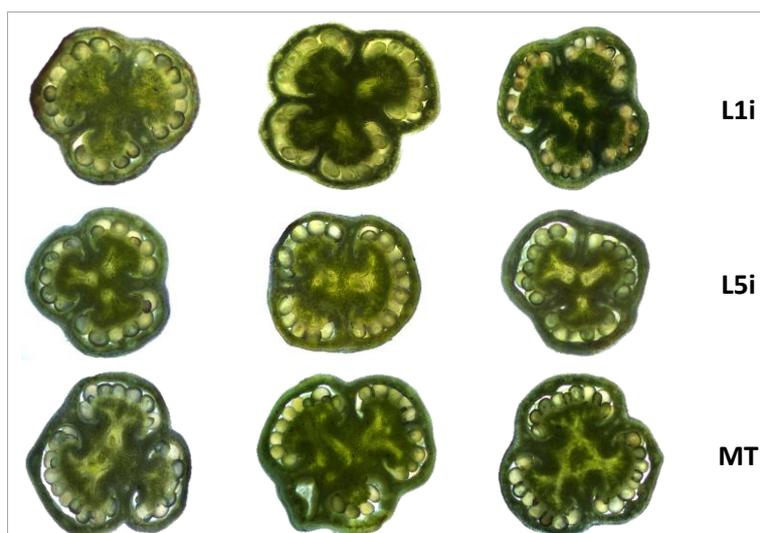
Por otra parte, la **Figura 8** representa la variación con el tiempo del patrón de ramificación del Lote 3, observándose un mayor aumento del número de ramas con el tiempo en la línea control MT, a diferencia de las líneas transgénicas L1i y L5i, donde la aparición de ramas laterales es más lenta y se aprecia un menor número de ramas totales. Por lo tanto, en este lote de plantas también se confirma la inhibición de la ramificación de las líneas mutantes en comparación con la línea silvestre.

En conclusión, estos resultados confirman que nuestras líneas transgénicas L1i y L5i mantienen el fenotipo en todos los lotes, pues éstas muestran una inhibición significativa en la ramificación, lo que se traduce, como se observa, en un retraso en la aparición de ramas laterales y un número menor de ramas totales por planta. Este hecho podría ser resultado del aumento de giberelinas activas en las yemas axilares y la consecuente reducción de las inactivas (GA<sub>29</sub> y GA<sub>51</sub>) por el silenciamiento de las enzimas GA 2-oxidadas, lo que sugiere que la inhibición de la ramificación está mediada por GAs y que las enzimas GA 2-oxidadas son importantes en la regulación de los niveles de GAs activas en las yemas axilares de tomate (Martínez-Bello *et al.*, 2015).

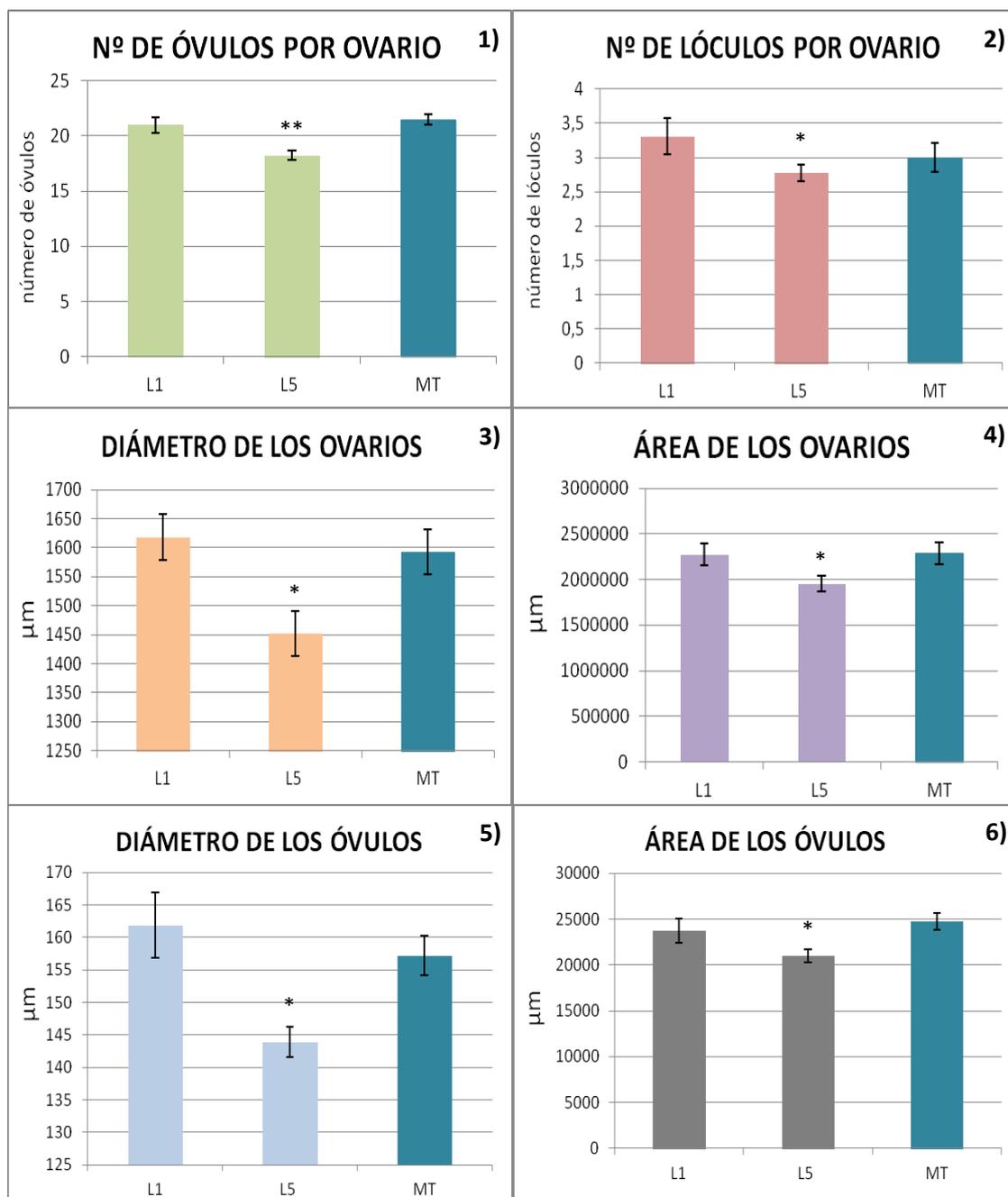
#### 4.2.2. Estudio de alteraciones fenotípicas de los ovarios y óvulos.

La caracterización fenotípica y el estudio del número y la morfología de los ovarios y óvulos de las líneas transgénicas L1i y L5i y de la línea control MT, se llevó a cabo para determinar el efecto de las GAs sobre el desarrollo de los óvulos. Para ello, los datos obtenidos del análisis de las imágenes de los cortes trasversales de ovarios de las líneas L1i y L5i, se compararon con los obtenidos de MT, a fin de analizar las posibles diferencias en el número y la morfología de los ovarios y óvulos entre los mutantes y el control.

A partir de las imágenes obtenidas con el microscopio Leica DM5000 de los cortes con vibratomo de 13 ovarios de cada línea (**Figura 9**), se calculó, mediante el programa de dominio público ImageJ, el diámetro y el área de cada uno de los ovarios de los cortes seleccionados (sólo un corte por ovario) y de diez de sus óvulos, así como el número de óvulos y lóculos por ovario, obteniéndose los resultados que se muestran en la **Figura 10**.



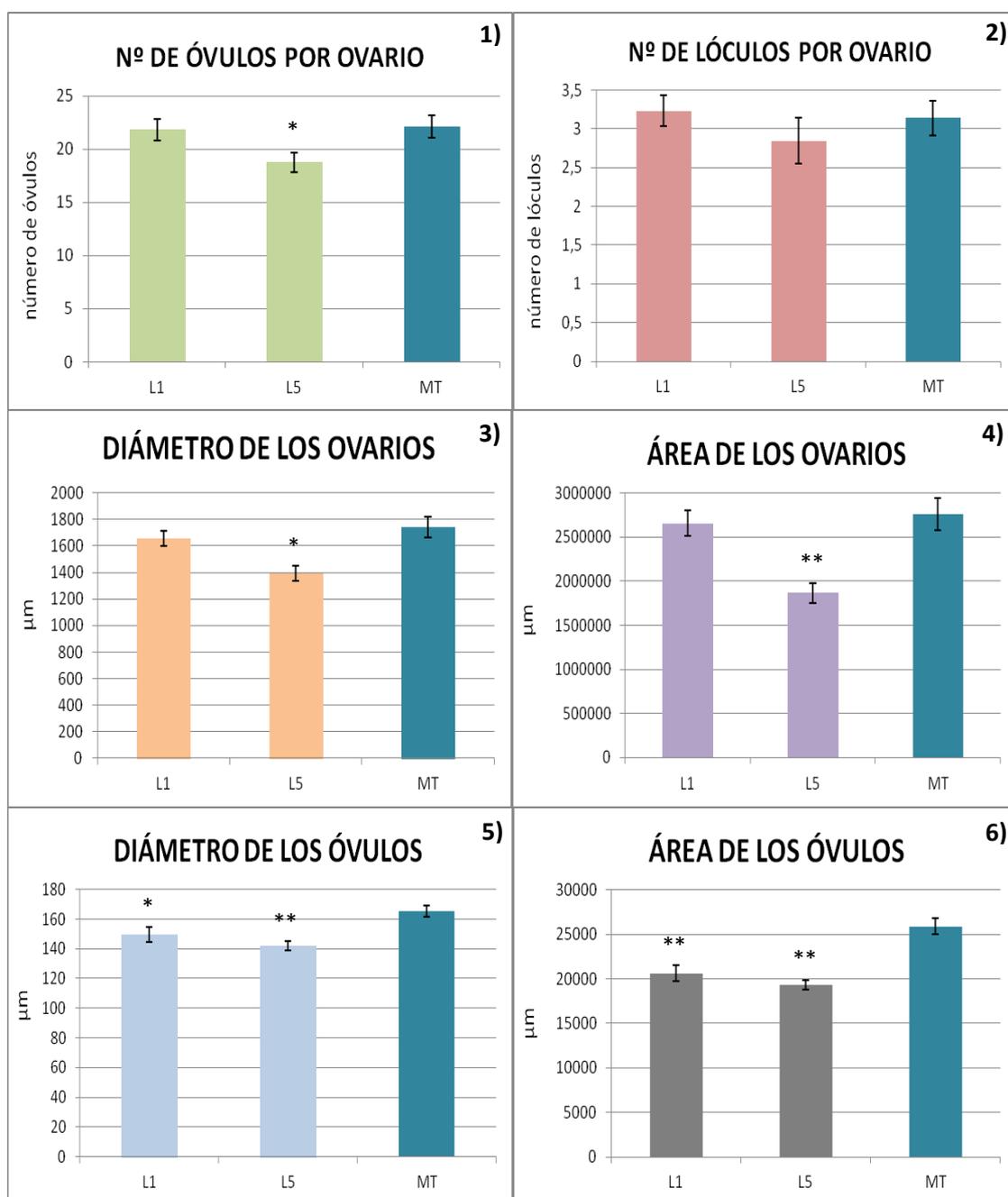
**Figura 9.** Fotografías obtenidas con el microscopio electrónico Leica DM5000 de cortes trasversales de ovarios de L1i, L5i y MT.



**Figura 10.** Resultados de la caracterización fenotípica de los ovarios y óvulos de plantas de las líneas L1i y L5i y el control MT (Lote 1). Resultados obtenidos respecto al número de óvulos (1) y lóculos (2) de cada ovario, el diámetro (3) y el área (4) de los ovarios, y el diámetro (5) y el área (6) de los óvulos. Los valores provienen del promedio de los resultados obtenidos de 13 ovarios por línea del Lote 1. La significación estadística entre los valores de las líneas transgénicas y el control están indicados (\*, estadísticamente significativo; \*\*, extremadamente significativo estadísticamente) ( $p < 0,005$ ).

Como se observa en la **Figura 10**, no hay diferencias significativas en la morfología de los ovarios y óvulos de L1i respecto al control MT, ni en el número de óvulos por ovario. Sin embargo, entre la línea L5i y el control, sí que se observan diferencias significativas en casi todos los parámetros analizados, lo que sugiere que las GAs podrían desempeñar un papel negativo sobre el desarrollo de los ovarios y óvulos, dando lugar a un número menor de óvulos en esta línea.

Estos resultados se obtuvieron de flores recolectadas del Lote 1, pero como se ha comentado en Materiales y métodos, se realizó un segundo experimento con flores del Lote 2 a fin de confirmar los resultados. Los datos obtenidos, mostrados en la **Figura 11**, fueron muy similares a los observados en el primer experimento.



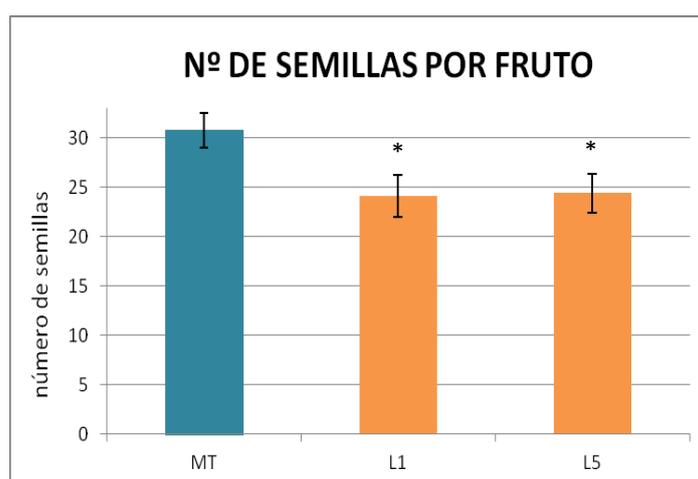
**Figura 11.** Resultados de la caracterización fenotípica de los ovarios y óvulos de plantas de las líneas L1i y L5i y el control MT (Lote 2). Resultados obtenidos respecto al número de óvulos (1) y lóculos (2) de cada ovario, el diámetro (3) y el área (4) de los ovarios, y el diámetro (5) y el área (6) de los óvulos. Los valores provienen de la media de los resultados obtenidos de 13 ovarios por línea del Lote 2. La significación estadística entre los valores de las líneas transgénicas y el control están indicados (\*, estadísticamente significativo; \*\*, extremadamente significativo estadísticamente) ( $p < 0,005$ ).

De este modo, se observa que el silenciamiento de los genes GA2ox, con el consecuente silenciamiento de las enzimas inactivadoras de GAs (GA 2-oxidasas), da lugar a una inhibición del desarrollo de los óvulos en la línea L5i, pues en ambos experimentos se observa una reducción en el número de óvulos respecto a MT, así como un tamaño menor, tanto de ovarios como de óvulos. Por lo tanto, con respecto a la línea transgénica L5i, se aprecia el efecto negativo de las GAs, reduciendo el número y tamaño de los óvulos y modificando la formación del ovario en tomate.

Sin embargo, en la línea L1i no se ha podido determinar esta inhibición, pues las diferencias entre esta línea y el control no son significativas en cuanto al número de óvulos y la morfología del ovario. No obstante, en el experimento realizado con el Lote 2 se observa una variación en el tamaño de los óvulos de esta línea, disminuyendo tanto el diámetro como el área, aunque al no haberse obtenido estos resultados en el primer experimento, no se puede afirmar el papel negativo de las GAs sobre el control del tamaño de los óvulos en esta línea. Las diferencias observadas entre ambos experimentos pueden deberse a factores ambientales.

El hecho de que la línea L5i muestre diferencias significativas respecto al control MT en la morfología de los ovarios y los óvulos y en el número final de éstos, pero no se observe este hecho en la línea L1i, no puede ser debido a una mayor eficiencia del transgén en la línea L5i (con el consiguiente mayor silenciamiento de los genes GA2ox), pues de ser así, se esperaría un mayor fenotipo de inhibición de la ramificación en esta línea en comparación con la línea L1i. Por lo tanto, las diferencias observadas entre ambas líneas podrían atribuirse a diferencias en la localización del transgén, lo que daría lugar a variaciones en la expresión de éste y por consiguiente, diferencias en el fenotipo entre ambas líneas. De este modo, en el caso de la línea L5i, este hecho podría dar lugar a una mayor expresión del transgén en los tejidos reproductivos y, por tanto, un mayor silenciamiento de los genes GA2ox, produciendo una inhibición significativa del desarrollo de los óvulos en esta línea.

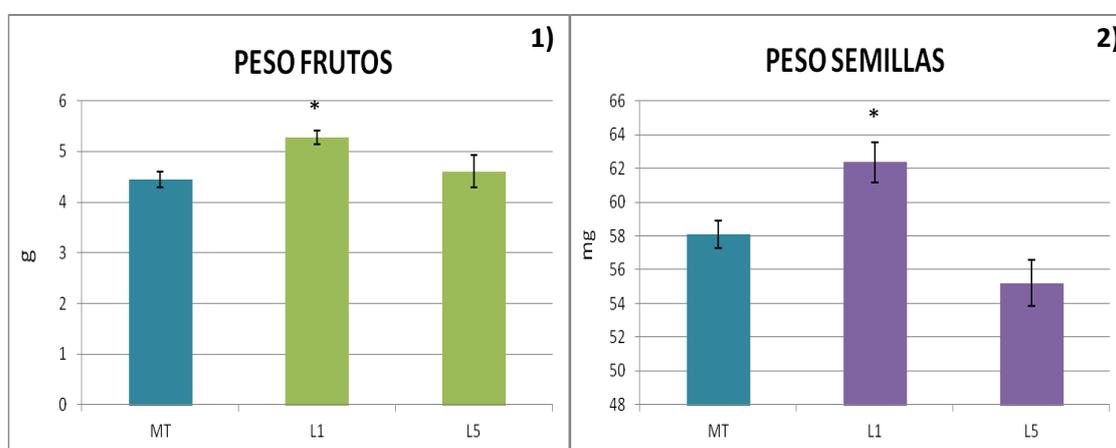
Por otra parte, se llevó a cabo la determinación del número de semillas por fruto de cada línea, para analizar el efecto del aumento de las giberelinas activas, procedente del silenciamiento de los genes GA2ox, sobre el número final de semillas por fruto. Para ello, se recogieron del Lote 1 un total de 20 tomates de la línea L1i y 27 de la línea L5i, y tras contar el número de semillas de cada fruto, los datos obtenidos se compararon con los resultantes del conteo de las semillas de 52 tomates del control MT. Los resultados se muestran en la **Figura 12**.



**Figura 12.** Resultados de la determinación del número de semillas por fruto en cada una de las líneas transgénicas, L1i y L5i, y en la línea control MT. Los valores provienen del promedio del número de semillas de 52 tomates en MT, 20 tomates en la línea L1i y 27 en L5i, recolectados del Lote 1. Las diferencias significativas estadísticamente entre el control MT y las líneas transgénicas están indicadas (\*, estadísticamente significativo) ( $p < 0,005$ ).

Como se observa en la **Figura 12**, el número de semillas es menor en las líneas transgénicas L1i y L5i, observándose diferencias significativas en ambas líneas con respecto a la línea isogénica control MT, lo que confirma el papel negativo de las GAs sobre el desarrollo de las semillas en tomate. En el caso de la línea L5i, esta disminución del número de semillas por fruto puede ser debida en parte al número limitado de óvulos que presenta, sin embargo, este hecho no puede atribuirse a la línea L1i, pues como se observa en la **Figura 9**, esta línea no presenta menos óvulos que la línea control. De este modo, el hecho de que la línea L1i presente un número menor de semillas por fruto respecto al control MT, a pesar de no haber diferencias en el número de óvulos entre ambas líneas, podría ser debido a dificultades en la polinización en L1i.

Además, se determinó el peso de los frutos utilizados para el conteo de las semillas, a fin de analizar si la variación en el número de semillas entre las distintas líneas se debía a un aumento o disminución del peso del fruto. El peso de las semillas contadas también se determinó para estudiar posibles alteraciones en su morfología. Los resultados de ambos estudios se muestran en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Resultados de la determinación del peso de los frutos (1) y las semillas (2) de cada línea. (1) Los valores de cada línea provienen del promedio del peso de 52 tomates en MT, de 20 tomates en la línea L1i y de 27 en L5i del Lote 1. (2) Los valores de cada línea provienen del promedio del peso de 6 réplicas por línea de 25 semillas cada una. Las diferencias significativas estadísticamente entre el control MT y las líneas transgénicas están indicadas (\*, estadísticamente significativo) ( $p < 0,005$ ).

Como se observa en la **Figura 13**, la línea L1i es la única que presenta una diferencia de peso significativa respecto al control MT, tanto en el peso de los frutos como en el de las semillas. Este aumento en el peso de las semillas puede ser debido al mayor tamaño de los frutos, pues al ser éstos más grandes, las semillas reciben más nutrientes y se desarrollan mejor. Por otra parte, el hecho de que los frutos de esta línea sean más grandes, debería dar lugar a un número mayor de semillas, sin embargo el número de éstas es menor, lo que podría ser debido a dificultades presentes en la polinización en la línea L1i, como ya se ha comentado anteriormente.

Como conclusión, el silenciamiento de los genes GA2ox, con el consecuente silenciamiento de las enzimas GA 2-oxidasas, da lugar a una inhibición del desarrollo de los óvulos en la línea L5i, lo que sugiere un papel negativo de las GAs sobre control del desarrollo de los óvulos en esta línea transgénica de tomate. Sin embargo, en cuanto a la línea L1i, no se observan diferencias respecto a la línea control MT en el fenotipo de los ovarios y los óvulos, lo que podría ser debido a diferencias en la localización del transgén en esta línea respecto a la línea L5i. Esto podría dar lugar a una menor expresión del transgén en los tejidos reproductivos en esta línea y por tanto, los efectos esperados sobre el desarrollo de los óvulos no se observan.

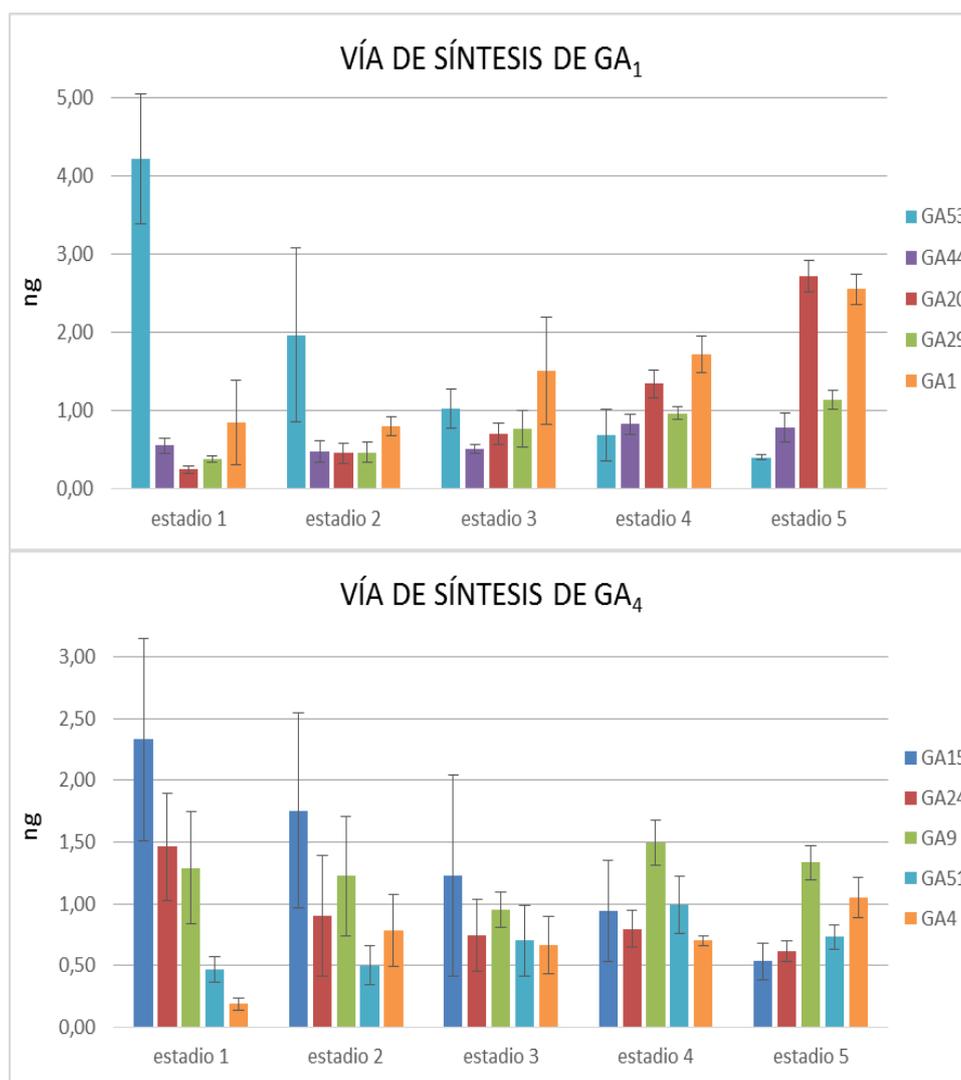
Por otra parte, el efecto del silenciamiento de los genes GA2ox sobre el desarrollo de las semillas se confirma en ambas líneas, pues se observa un número menor de éstas por fruto en las dos líneas transgénicas respecto a la línea control MT, lo que sugiere que las GAs podrían tener un papel negativo sobre el desarrollo de las semillas en tomate.

## 4.2. Cuantificación de hormonas.

La cuantificación de giberelinas por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS) se realizó para estudiar el efecto del silenciamiento de los genes GA2ox, que codifican las enzimas inactivadoras de giberelinas GA 2-oxidasas, sobre los niveles de estas hormonas en aquellas fases en que los óvulos se están desarrollando. De este modo, mediante este proceso se pretendía determinar si las giberelinas estaban alteradas en flores en desarrollo, comparando los niveles de esta hormona entre los mutantes y el control. Además, se quería comprobar si esta alteración influía en el metabolismo de otras hormonas, como auxinas (IAAs), ácido abscísico (ABA) o ácido jasmónico (JA), a través también de su cuantificación en los ovarios.

Para ello, en primer lugar se llevó a cabo la cuantificación de giberelinas en flores de distintos estadios de preantesis recolectadas de plantas MT del Lote 1 (**Figura 5**). En total se recogieron 5 muestras de entre 30 y 60 mg de cada uno de los tres primeros estadios, 4 muestras de 70 mg del estadio 4, y 3 muestras de unos 100 mg del estadio 5, y según como se recoge en Materiales y métodos, se cuantificó la cantidad de giberelinas presentes. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 14**.

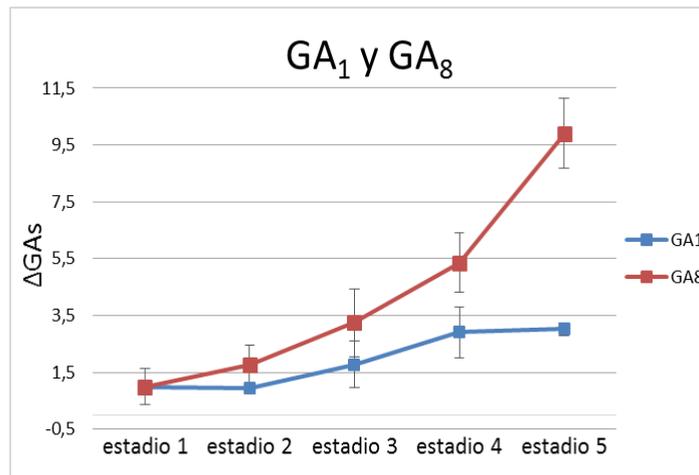
Como se observa en la **Figura 14**, en la vía de síntesis de la giberelina bioactiva GA<sub>1</sub> (vía de 13-hidroxilación), las giberelinas tienen el comportamiento esperado. La GA<sub>53</sub> va disminuyendo con el tiempo al ir transformándose en GA<sub>44</sub>, que se mantiene más o menos constante. En cuanto a las siguientes giberelinas de la vía, se aprecia un aumento hasta llegar a la GA<sub>1</sub>, cuyos niveles incrementan más notablemente. Por otra parte, en la vía de no-13-hidroxilación, el comportamiento de las giberelinas es parecido, disminuyendo los niveles de las primeras giberelinas de la vía y aumentando las finales, hasta llegar a la giberelina activa GA<sub>4</sub>.



**Figura 14.** Resultados de la cuantificación de las distintas GAs presentes en la ruta de biosíntesis de esta hormona en plantas control MT. Los valores provienen de la media de 5 muestras de flores preantesis de plantas control MT en cada uno de los tres primeros estadios, 4 muestras en el cuarto estadio y 3 muestras en el quinto.

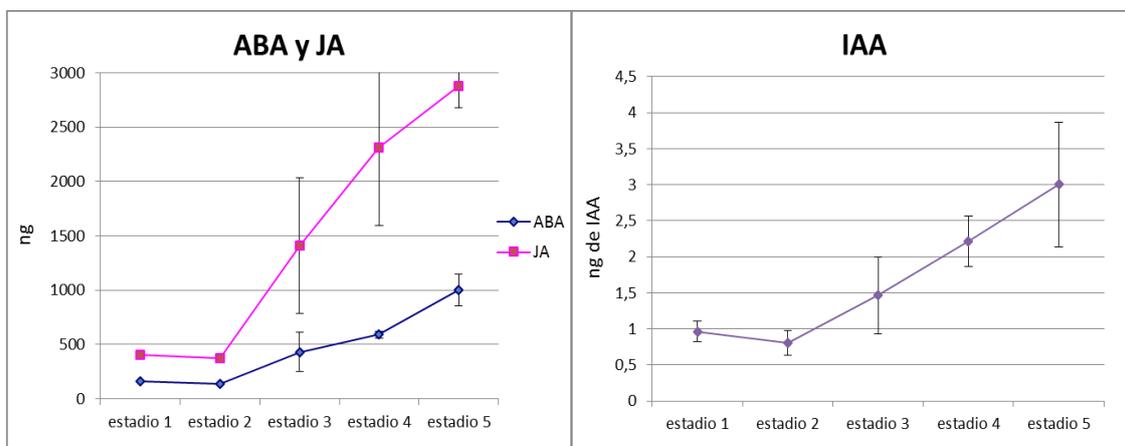
Sin embargo, aunque el comportamiento de ambas vías es similar, se aprecia un mayor nivel global de las giberelinas de la vía de 13-hidroxilación, pues como es conocido, es la vía más utilizada en tomate (Serrani *et al.*, 2007a). De este modo, como era de esperar, se observa una mayor cantidad de giberelina bioactiva GA<sub>1</sub> en comparación con los niveles de GA<sub>4</sub>. Las variaciones de los niveles de GAs entre las distintas vías y entre la misma vía, pueden deberse a diferentes afinidades del enzima GA 20-oxidasa por sus diferentes sustratos y a diferentes eficiencias entre etapas de la ruta.

Centrándonos en la vía de 13-hidroxilación, al ser la más abundante, se analizaron los niveles de la giberelina procedente de la inactivación de GA<sub>1</sub> mediante la enzima GA 2-oxidasa, la GA<sub>8</sub>. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 15**, donde se observa que los niveles globales de esta hormona (GA<sub>8</sub>) son mucho mayores que los de su giberelina activa (GA<sub>1</sub>) y que éstos aumentan mucho del estadio 4 al 5, lo que sugiere la importancia de la enzima inactivadora de giberelinas GA2-ox en esta fase del desarrollo de las flores en plantas de tomate.



**Figura 15.** Incremento de los niveles de la giberelina bioactiva  $GA_1$  y de su producto de inactivación por la enzima GA 2-oxidasa,  $GA_8$ , a lo largo de los distintos estadios del desarrollo de la flor. Los valores muestran el incremento de los niveles de  $GA_1$  y  $GA_8$  a lo largo de los distintos estadios respecto a su nivel en el estadio 1.

Además de analizar los niveles de giberelinas en las plantas control MT, se cuantificaron también otras hormonas como las auxinas (IAA), el ácido abscísico (ABA) y el ácido jasmónico (JA) (**Figura 16**), con el fin de comprobar los niveles normales de estas hormonas en las plantas control y después poder compararlos con los niveles detectados en las líneas transgénicas L1i y L5i, y detectar posibles interacciones entre las GAs y estas hormonas durante el desarrollo de la flor.

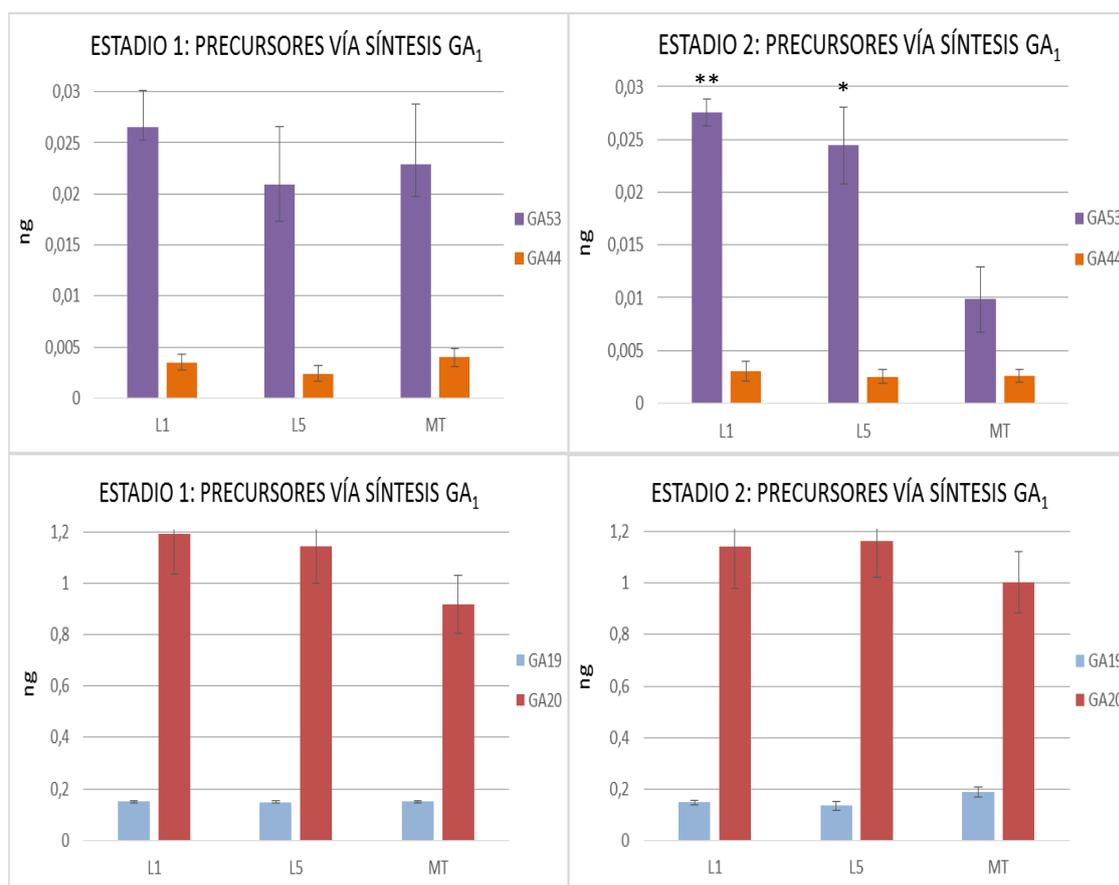


**Figura 16.** Resultados de la cuantificación de ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y auxinas (IAA) en los diferentes estadios del desarrollo de flores de plantas control MT. Los valores provienen de la media de 5 muestras de flores preantesis de plantas control MT en cada uno de los tres primeros estadios, 4 muestras en el cuarto estadio y 3 muestras en el quinto.

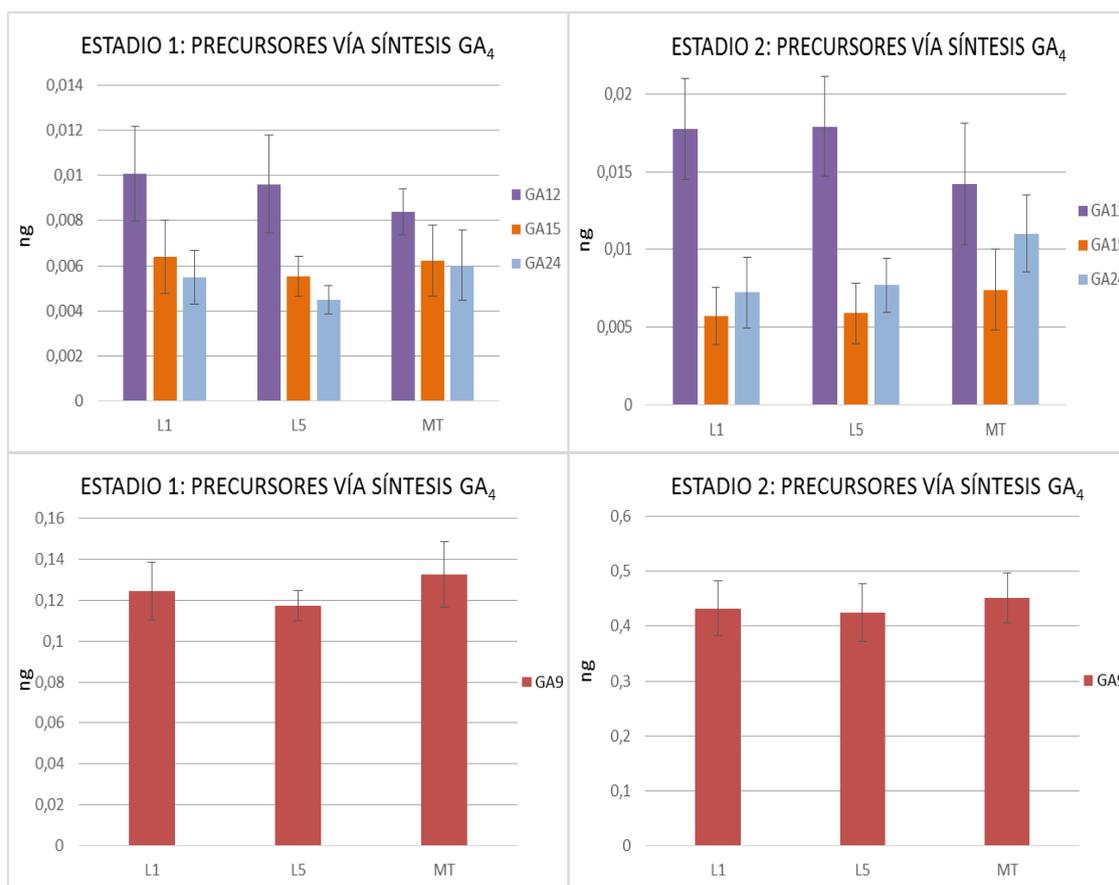
Como se observa en la **Figura 16**, los niveles de estas hormonas (IAA, ABA y JA) aumentan a lo largo de los distintos estadios de desarrollo de las flores en MT, aunque el papel de estas hormonas parece ser más importante a partir del estadio 2, donde los niveles empiezan a aumentar considerablemente.

Por otra parte, en segundo lugar se llevó a cabo la cuantificación de giberelinas en flores del estadio 1 y 2 (**Figura 5**) de las líneas transgénicas L1i y L5i y de la línea control MT, en este caso utilizando flores de plantas del Lote 2. De este modo, se pretendían analizar las posibles diferencias en los niveles de GAs entre las líneas mutantes y la silvestre en estos estadios, al ser los estadios más tempranos y posiblemente más determinantes en el desarrollo de los óvulos. Además, también se analizaron los niveles hormonales de auxinas (IAA), ácido abscísico (ABA) y ácido jasmónico (JA) para comprobar si las alteraciones producidas por el silenciamiento de los genes GA2ox en las líneas transgénicas influía en el metabolismo de estas hormonas.

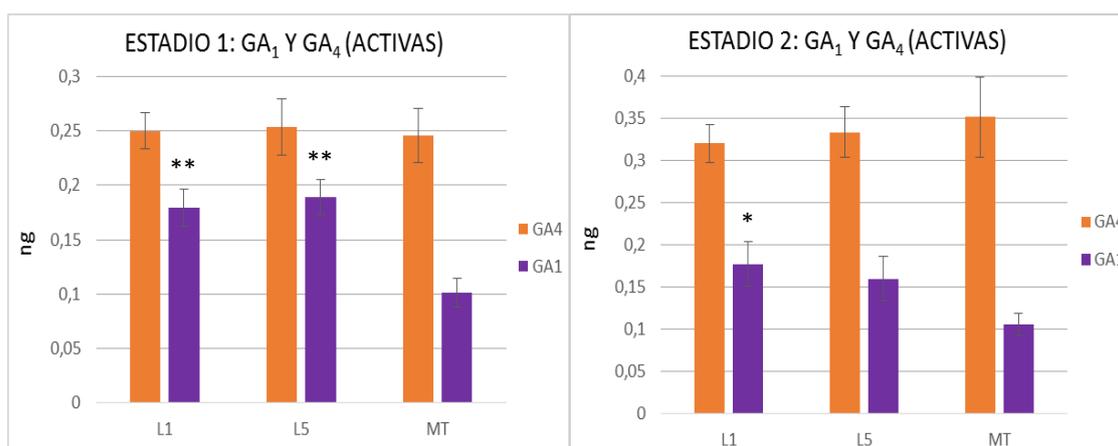
Para ello, se recolectaron un total de 10 muestras por línea del estadio 1, de entre 30 y 60 mg cada una, y 9 muestras del mismo peso del estadio 2, y se cuantificaron los niveles de giberelinas como se explica en el apartado de Materiales y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 17**, la **Figura 18**, la **Figura 19** y la **Figura 20**.



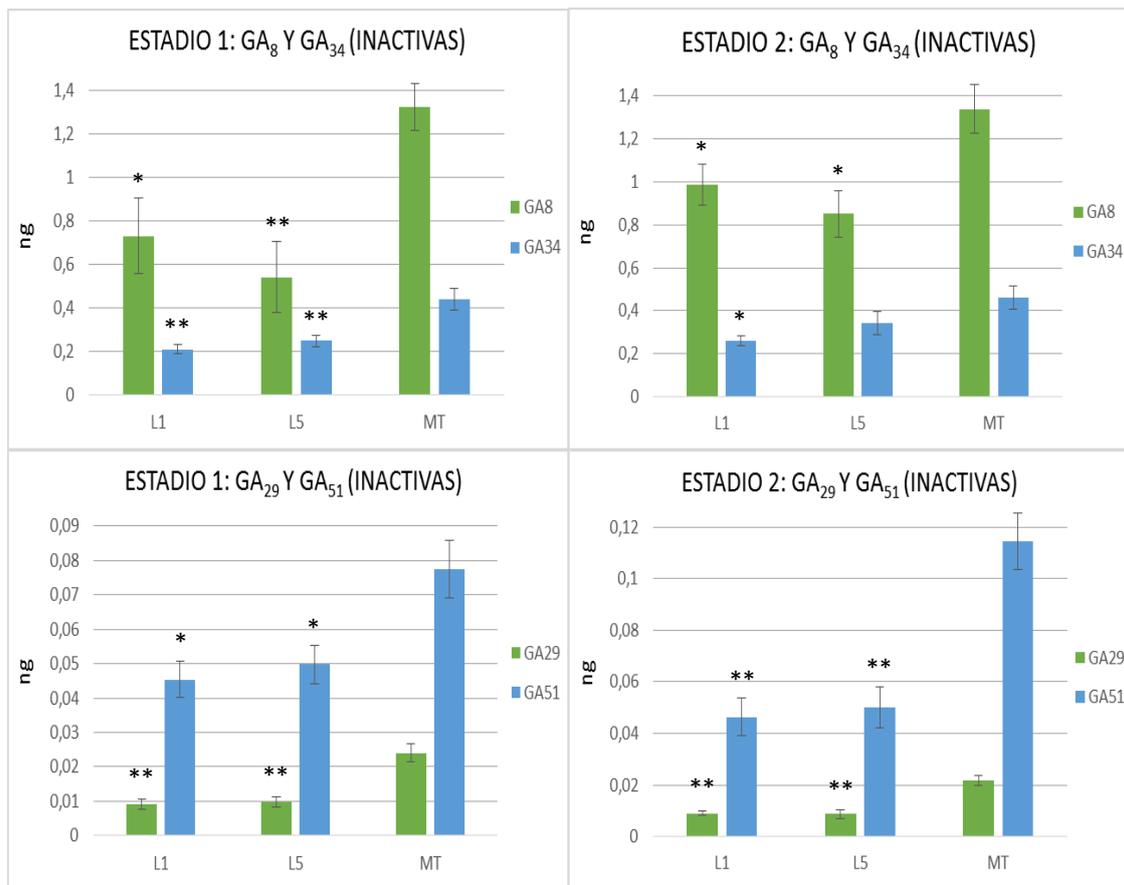
**Figura 17.** Resultados de la cuantificación de las giberelinas precursoras de GA<sub>1</sub> en los primeros estadios del desarrollo de las flores de L1i, L5i y MT. Los valores obtenidos de cada línea provienen del promedio de 10 muestras de flores en el estadio 1, tanto de la línea control MT como de las transgénicas L1i y L5i, y de 9 muestras de flores en el estadio 2. La significación estadística entre los valores de las líneas transgénicas y el control están indicados (\*, estadísticamente significativo; \*\*, extremadamente significativo estadísticamente) ( $p < 0,005$ ).



**Figura 18.** Resultados de la cuantificación de las giberelinas precursoras de GA<sub>4</sub> en los primeros estadios del desarrollo de las flores de L1i, L5i y MT. Los valores obtenidos de cada línea provienen del promedio de 10 muestras de flores en el estadio 1, tanto de la línea control MT como de las transgénicas L1i y L5i, y de 9 muestras de flores en el estadio 2. La significación estadística entre los valores de las líneas transgénicas y el control están indicados (\*, estadísticamente significativo; \*\*, extremadamente significativo estadísticamente) ( $p < 0,005$ ).



**Figura 19.** Resultados de la cuantificación de las giberelinas bioactivas GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> en los primeros estadios del desarrollo de las flores de L1i, L5i y MT. Los valores de cada línea provienen del promedio de 10 muestras de flores en el estadio 1, tanto de la línea control MT como de las transgénicas L1i y L5i, y de 9 muestras de flores en el estadio 2. La significación estadística entre los valores de las líneas transgénicas y el control están indicados (\*, estadísticamente significativo; \*\*, extremadamente significativo estadísticamente) ( $p < 0,005$ ).



**Figura 20.** Resultados de la cuantificación de las giberelinas inactivas  $GA_8$ ,  $GA_{34}$ ,  $GA_{29}$  y  $GA_{51}$ , productos de la inactivación mediante la enzima GA 2-oxidasa, en los primeros estadios del desarrollo de las flores de L1i, L5i y MT. Los valores de cada línea provienen del promedio de 10 muestras de flores en el estadio 1, tanto de la línea control MT como de las transgénicas L1i y L5i, y de 9 muestras de flores en el estadio 2. La significación estadística entre los valores de las líneas transgénicas y el control están indicados (\*, estadísticamente significativo; \*\*, extremadamente significativo estadísticamente) ( $p < 0,005$ ).

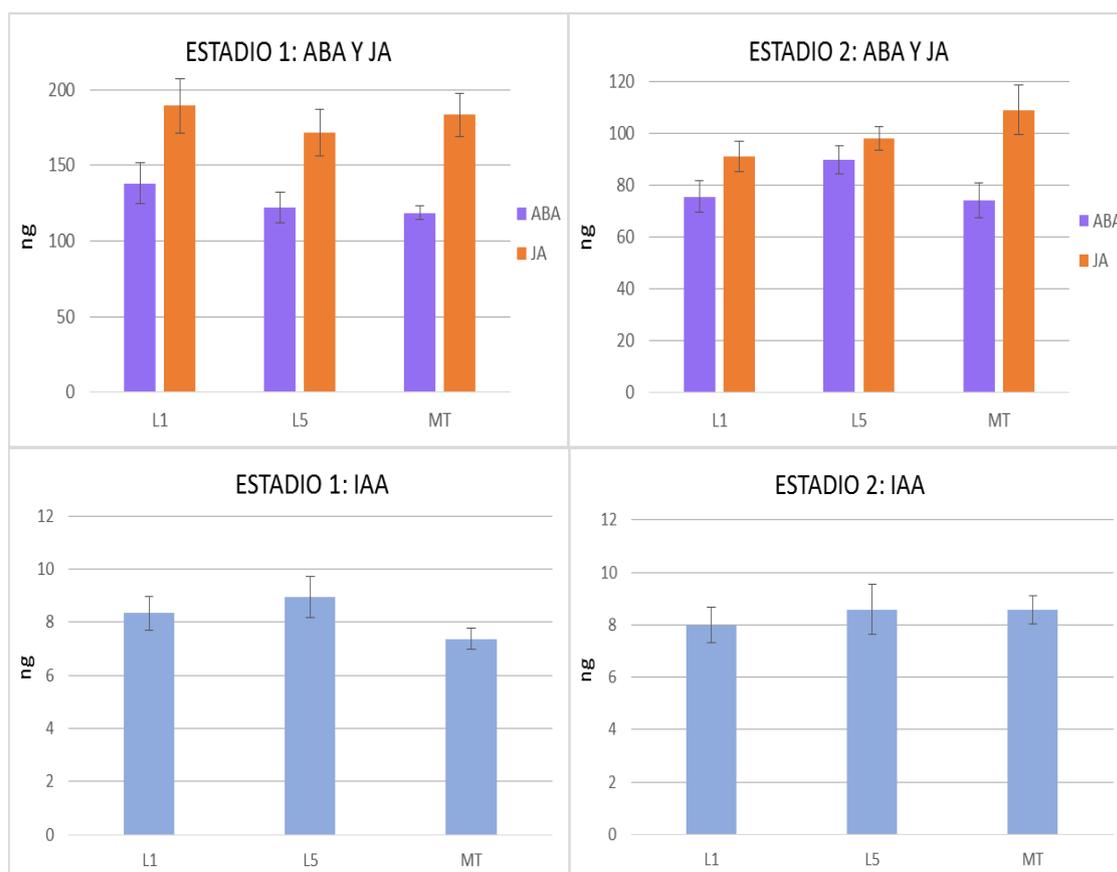
Como se observa en la **Figura 17** y en la **Figura 18**, no existen diferencias significativas en los niveles de las primeras giberelinas de la vía, las giberelinas precursoras de las formas bioactivas de esta hormona ( $GA_1$  Y  $GA_4$ ) (**Figura 1**), lo que era de esperar en este tipo de mutantes. Sin embargo, la  $GA_{53}$  presenta diferencias en el segundo estadio de desarrollo de las flores, siendo los niveles más altos en las líneas L1i y L5i en comparación con MT.

En cuanto a los niveles de las giberelinas bioactivas  $GA_1$  y  $GA_4$  (**Figura 19**) y de los productos inactivos obtenidos mediante la actividad de la enzima GA 2-oxidasa ( $GA_8$ ,  $GA_{34}$ ,  $GA_{29}$  y  $GA_{51}$ ) (**Figura 20**), se observan diferencias significativas en los niveles hormonales de los mutantes respecto al control, sobre todo en el primer estadio del desarrollo de la flor.

Las enzimas GA 2-oxidasa catalizan la adición de un grupo hidroxilo en el carbono C-2 de las giberelinas activas,  $GA_1$  y  $GA_4$ , y de sus precursores inmediatos,  $GA_{20}$  y  $GA_9$ , respectivamente, provocando la pérdida de su actividad biológica. Por lo tanto, se esperaría que el silenciamiento de los genes GA2ox en las líneas L1i y L5i produjera una acumulación de GAs activas y una disminución en los productos inactivos ( $GA_{29}$ ,  $GA_8$ ,  $GA_{51}$  y  $GA_{34}$ ). Sin embargo, respecto a las giberelinas activas, mientras que los niveles de  $GA_1$  aumentan en las líneas transgénicas, los niveles de  $GA_4$  se mantienen inalterados (**Figura 19**), lo que resulta inesperado, pues ambas GAs son sustratos de la enzima GA 2-oxidasa. Esto podría explicarse por el hecho de que la vía de 13-hidroxilación es la vía más utilizada en la ruta de biosíntesis de

las giberelinas en tomate (vía encargada de la síntesis de GA<sub>1</sub>), y por lo tanto, el efecto del silenciamiento de las enzimas GA 2-oxidasas podría ser más significativo en esta vía. Por otra parte, los niveles de los precursores inmediatos de las giberelinas activas, GA<sub>9</sub> y GA<sub>20</sub>, no se ven afectados (**Figura 17** y **Figura 18**), lo que podría darse debido a la complejidad de la ruta (**Figura 1**). Por último, en cuanto a los productos inactivos (**Figura 20**), se observa una disminución en los niveles de todos, lo que era de esperar como resultado del silenciamiento de los genes GA2ox en las líneas transgénicas L1i y L5i.

En general, los niveles hormonales de giberelinas en las líneas transgénicas L1i y L5i son muy parecidos, lo que no era de esperar debido a sus diferencias fenotípicas en los ovarios y óvulos, observadas en los resultados obtenidos en el apartado anterior (**Figura 10** y **Figura 11**). En ese estudio, se analizaron las alteraciones fenotípicas en ovarios y óvulos de las líneas transgénicas respecto al control MT, observándose variaciones en el fenotipo sobre todo en L5i, donde el efecto del silenciamiento de las enzimas GA 2-oxidasas da lugar a una inhibición del desarrollo de los óvulos y a una disminución del número final de éstos. Sin embargo, este papel negativo de las GAs sobre el desarrollo de los óvulos no se observa en la línea L1i, en la cual el número y morfología de los óvulos se mantiene casi inalterado respecto al control. Por esta razón, era de esperar que estas diferencias fenotípicas entre las líneas transgénicas se debieran a diferencias en los niveles de giberelinas, suponiendo un mayor efecto del silenciamiento de las enzimas GA 2-oxidasas en L5i (mayores niveles de GAs activas). No obstante, este hecho no se observa, lo que podría ser debido a diferencias en la localización del transgén 35S::GA2ox/RNAi, dando lugar a variaciones en la expresión de éste y provocando estas diferencias fenotípicas entre ambas líneas.



**Figura 21.** Resultados de la cuantificación de ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y auxinas (IAA) en los primeros estadios del desarrollo de las flores de L1i, L5i y MT. Los valores de cada línea provienen del promedio de 10 muestras de flores en el estadio 1, tanto de la línea control MT como de las transgénicas L1i y L5i, y de 9 muestras de flores en el estadio 2. La

*significación estadística entre los valores de las líneas transgénicas y el control están indicados (\*, estadísticamente significativo; \*\*, extremadamente significativo estadísticamente) ( $p < 0,005$ ).*

Por otra parte, los resultados obtenidos del análisis de los niveles hormonales de auxinas (IAA), ácido abscísico (ABA) y ácido jasmónico (JA) en flores del estadio 1 y 2 (**Figura 21**), no muestran diferencias significativas entre los mutantes y el control, lo que indica que el silenciamiento de las enzimas GA 2-oxidasas, con el consiguiente aumento de la giberelina bioactiva GA<sub>1</sub>, no influye en el metabolismo de estas hormonas. Además, este hecho confirma los resultados obtenidos en el experimento realizado con el Lote 1 (**Figura 16**), donde sólo se analizan los niveles de estas hormonas en los distintos estadios del desarrollo de flores de MT, y donde se observaba que estas hormonas no parecían ser importantes en los primeros estadios de desarrollo de la flor (estadio 1 y 2), los estadios estudiados en este último experimento. De este modo, el hecho de que los niveles de estas hormonas no cambien con la variación de los niveles de GAs, podría explicarse, además de por la posible no interacción entre las giberelinas y estas hormonas, por la insignificancia del efecto de estas hormonas sobre el desarrollo de las flores en estadios tempranos.

En conclusión, la supresión de las GA 2-oxidasas debería aumentar los niveles de las giberelinas bioactivas GA4 y GA1, así como de sus precursores inmediatos, GA9 y GA20, y disminuir los niveles de los productos inactivos de esta enzima GA51, GA34, GA29 y GA8. Sin embargo, aunque los niveles de los productos inactivos sí que disminuyen, sólo se observa un aumento en los niveles de la giberelina bioactiva GA1, mientras que la GA4 se mantiene inalterada. Esto podría explicarse suponiendo que las enzimas GA 3-oxidasas tienen más afinidad por el sustrato GA20, lo que favorece la conversión de GA20 en GA1 en lugar de convertir a GA9 en GA4, o por otra parte, suponer una mayor importancia de las enzimas GA 2-oxidasas en la vía de síntesis de GA1, al ser la vía mayoritaria en tomates, lo que daría lugar un mayor impacto en los niveles hormonales de esta parte de la ruta. Por otra parte, en este experimento se confirma que las variaciones en los niveles de giberelinas no afectan a otras hormonas como las auxinas, el ácido abscísico o el ácido jasmónico, lo que sugiere que no existe interacción entre las GAs y estas hormonas en estadios tempranos del desarrollo de las flores.

## 5. Conclusiones.

1. El silenciamiento de los genes *GA2ox*, con la consecuente supresión de las enzimas GA 2-oxidasas, produce un aumento significativo de los niveles de la giberelina bioactiva  $GA_1$  en los tejidos reproductivos de las líneas transgénicas de tomate y una disminución de los productos inactivos  $GA_{51}$ ,  $GA_{34}$ ,  $GA_{29}$  y  $GA_8$  en fases tempranas del desarrollo de la flor.
2. El aumento de la giberelina bioactiva  $GA_1$  tiene un efecto negativo sobre el número de óvulos en la línea transgénica L5i, apoyando el papel inhibitorio de las GAs en el desarrollo de los óvulos y sugiriendo un posible papel de las enzimas GA 2-oxidasas en este proceso.
3. Las variaciones en los niveles de giberelinas no afectan al metabolismo de otras hormonas como auxinas, ácido abscísico o ácido jasmónico, lo que sugiere que éstas no interaccionan con las GAs en estadios tempranos del desarrollo.

## 6. Bibliografía.

BOHNER, J.; HEDDEN, P.; BORA-HABER, E.; BANGERTH, F. 1988. Identification and quantitation of gibberellins in fruits of *Lycopersicon esculentum*, and their relationship to fruit size in *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Physiologia Plantarum*. 73: 348-353.

CARRERA, E.; RUIZ-RIVERO, O.; PEREIRA, LE.; ATARES, A.; GARCÍA-MARTÍNEZ, JL. 2012. Characterization of the procerato tomato mutant shows novel functions of the SIDELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. *Plant Physiology*. 160: 1581-1596.

CARVALHO, RF.; CAMPOS, ML.; PINO, LE.; CRESTANA, SL.; ZSÖGÖN, A.; LIMA, JE.; BENEDITO, VA.; PERES, LEP. 2011. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*. 7: 18-31.

CUCINOTTA, M.; COLOMBO, L.; ROIG-VILLANOVA, I. 2014. Ovule development, a new model for lateral organ formation. *Frontiers in plant science*. 5: 117.

FOS, M.; NUEZ, F.; GARCÍA-MARTÍNEZ, JL. 2000. The gene pat-2, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiology*. 122: 471-479.

GARCÍA-HURTADO, N.; CARRERA, E.; RUIZ-RIVERO, O.; LÓPEZ-GRESA, MP.; HEDDEN, P.; GONG, F.; GARCÍA-MARTÍNEZ, JL. 2012. The characterization of transgenic tomato overexpressing gibberellin 20-oxidase reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration of the gibberellin biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*. 63: 5803-5813.

HEDDEN, P.; THOMAS, SG. 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal*. 444: 11-25.

HUANG, HY.; JIANG, WB.; HU, YW.; WU, P.; ZHU, JY.; LIANG, WQ.; WANG, ZY.; LIN, WH. 2012. BR signal influences arabidopsis ovule and seed number through regulating related genes expression by BZR1. *Mol. Plant*. 6: 456-469. doi: 10.1093/mp/sss070.

KOSHIOKA, M.; NISHIJIMA, T.; YAMAZAKI, H.; LIU, Y.; NONAKA, M., MANDER LN. 1994. Analysis of gibberellins in growing fruits of *Lycopersicon esculentum* after pollination or treatment with 4-chlorophenoxyacetic acid. *Journal of Horticultural Science*. 69: 171-179.

LEE, DJ.; ZEEVAART, JAD. 2005. Molecular cloning of GA 2-oxidase3 from spinach and its ectopic expression in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol*. 138: 243-254.

MAGOME, H.; NOMURA, T.; HANADA, A.; TAKEDA-KAMIYA, N.; OHNISHI, T.; SHINMAD, Y.; KATSUMATA, T.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. 2013. CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110: 1947-1952.

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, GJ.; DIXON, MS.; GARCÍA-MARTÍNEZ JL. 2006. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*. 57: 2037-2047.

- MARTÍNEZ-BELLO, L.; MORITZ, T.; LÓPEZ-DÍAZ, I. 2015. Silencing C19-GA 2-oxidases induces parthenocarpic development and inhibits lateral branching in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*. 66: 5897-5910.
- MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. 1997. A new model system for tomato genetics. *The Plant Journal*. 12: 1465-1472.
- MUTASA-GÖTTGENS, E.; HEDDEN, P. 2009. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*. 60: 1979-1989.
- NEMHAUSER, J. L.; FELDMAN, L. J.; AND ZAMBRYSKI, P. C. 2000. Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. *Development*. 127: 3877-3888.
- OLSZEWSKI, N.; SUN, TP.; GUBLER, F. 2002. Gibberellin signalling, biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell*. 14: S61-S80.
- PESARESI, P.; MIZZOTTI, C.; COLOMBO, M.; MASIERO, S. 2014. Genetic regulation and structural changes during tomato fruit development and ripening. *Front Plant Sci*. 5: 124.
- RANJAN, A.; ICHIHASHI, Y.; SINHA, NR. 2012. The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. *Genome Biology*. 13: 167-174.
- REYES-OLALDE, JI.; ZUÑIGA-MAYO, VM.; CHÁVEZMONTES, RA.; MARSCH-MARTÍNEZ, N.; DE FOLTER, S. 2013. Inside the gynoecium: at the carpel margin. *Trends Plant Sci*. 18: 644-655.
- RIEU, I.; ERIKSSON, S.; POWERS, SJ.; *et al.* 2008. Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 20: 2420-2436.
- SCHWECHHEIMER, D. 2008. Understanding gibberellic acid signalling-are we there yet? *Current Opinion in Plant Biology*. 11: 9-15.
- SERRANI, JC.; FOS, M.; ATARÉS, A.; GARCÍA-MARTÍNEZ, JL. 2007b. Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv. Micro-Tom of tomato. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26: 211-221.
- SERRANI, JC.; SANJUAN, R.; RUIZ-RIVERO, O.; FOS, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, JL. 2007a. Gibberellin regulation of fruit-set and growth in tomato. *Plant Physiology*. 145: 246-257.
- SEYMOUR, GB.; OSTERGAARD, L.; CHAPMAN, NH.; KNAPP, S.; MARTIN, C. 2013. Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*. 64: 219-241.
- SJUT, V.; BANGERTH, F. 1982/1983. Induced parthenocarpy-a way of changing the levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.). 1. Extractable hormones. *Plant Growth Regulation*. 1: 243-251.
- THOMAS, SG.; PHILLIPS, AL.; HEDDEN, P. 1999. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 4698-4703.
- YAMAGUCHI, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology* 59: 225-251.