



IBMCP-CSIC-UPV

Departamento de Biotecnología

**“Estudio transcriptómico y metabolómico del desarrollo partenocárpico del fruto del tomate y aplicaciones biotecnológicas”**

---

Memoria presentada por:

**Leandro Hueso Estornell**

Para optar al grado de  
**Doctor en Ciencias  
Biológicas**

Director:

**Dr. Antonio Granell Richart.**

Co-director:

**Dr. Diego Orzaez Calatayud.**

València, 2010



## Agradecimientos

Este trabajo es producto de la ayuda inestimable de muchas personas que durante mi estancia en el IBMCP me han guiado y aconsejado y también de quienes me han apoyado en las situaciones más complicadas.

En primer lugar agradecer al director de esta tesis el Dr. Antonio Granell por su guía y sabios consejos. Principalmente por darme la oportunidad de trabajar en este campo y en un laboratorio en el que hay gente excepcional.

Mención especial en esta sección merece el Dr. Diego Orzaez, co-director de esta tesis, por su apoyo incondicional y ayuda inestimable a la realización y publicación de parte de este trabajo, así como por sus útiles consejos sobre la importancia de los controles y aspectos del clonaje que me eran completamente desconocidos.

La ayuda de las personas del antiguo laboratorio 13 ha sido fundamental, de los que ya estaban en el laboratorio: Cristina Martí, Carol, Sophie y por supuesto de Clara a quien le debo gran parte de mis conocimientos prácticos, sobretodo de hibridación y análisis de "microarrays", pero también de los "recién" llegados José Luis, Asun, Patricia, Paloma, Gerardo... y de la gente que ha ido pasado por el laboratorio: Aurora, Paco, Lucas, Sara... Todos han aportado su grano de arena a la realización de este trabajo y les estoy muy agradecido.

Agradecer la ayuda de la gente de otros laboratorios en momentos determinados Dr. Juan Carbonell, Dr. David Alabadí, Dr. Miguel Ángel Pérez, Dr. Miguel Ángel Blázquez, M<sup>a</sup> Ángeles, Paco Vera, Cristina Úrbez y en general todos los de la 2<sup>o</sup> planta y la gente del laboratorio del Dr. José Pio.

Durante mi estancia en Alemania, la ayuda de la Dra. Ana Lytovchenko y del resto de la gente del laboratorio del Dr. Fernie en el MPI de Gölm también ha sido muy importante.

Por supuesto, agradecer la labor del personal del invernadero que ha cuidado de mis plantas y que por lo tanto ha sido fundamental en la realización de esta tesis: Rafa Martínez, Carmen, Toni.... También agradecer la ayuda de la gente del servicio de microscopía: MD y Marisol, y del laboratorio de Genómica en la parte del análisis de los "microarrays": M<sup>a</sup> Ángeles, Dr. Pepe Gadea, Dr. Javier Forment...

Por último quiero agradecer el apoyo importante que he recibido en todo momento de mi familia y de mi mujer Inma, y que ha influenciado decisivamente en la determinación de seguir adelante durante todo este tiempo.



Parte de este trabajo ha sido publicado en:

**Plant biotechnology journal.** 2009 Apr;7(3):298-309.

Estornell LH, Orzaez D, Lopez-Pena L, Pineda B, Anton MT, Moreno V and Granell A (2009) **A multisite gateway-based toolkit for targeted gene expression and hairpin RNA silencing in tomato fruits.** *Plant Biotechnol J* 7:298-309.

### **SOLICITUD DE PATENTES**

*AUTORES (p.o de firma) Leandro Hueso Estornell, Diego Orzaez Calatayud, Benito Pineda Chaza, Teresa Anton Martinez, Vicente Moreno Ferrero, Antonio Granell Richart.*

**TÍTULO Promotor Constitutivo de Solanum lycopersicum**

Núm. DE SOLICITUD P200802207

Fecha de publicación internacional: 28/01/2010

Número de publicación internacional (PCT): WO 2010/010207 A1

*AUTORES (p.o de firma) Diego Orzaez Calatayud, Leandro Hueso Estornell, Benito Pineda Chaza, Teresa Anton Martinez, Vicente Moreno Ferrero, Antonio Granell Richart.*

**TÍTULO Promotor específico del fruto de Solanum lycopersicum**

Núm. DE SOLICITUD P200802289

Fecha de publicación internacional: 04/02/2010

Número de publicación internacional (PCT): WO 2010/012848 A1



<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>RESUM</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>17</b>
<b>ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO/METABOLÓMICO DEL DESARROLLO PARTENOCÁRPICO DEL FRUTO INDUCIDO MEDIANTE VÍA HORMONAL EN <i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i></b> .....	<b>17</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>17</b>
PAPEL DE LAS HORMONAS EN LA INDUCCIÓN DE LA FRUCTIFICACIÓN .....	17
<b>1.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
MATERIAL BIOLÓGICO .....	29
EXTRACCIÓN DE ARN .....	29
HIBRIDACIÓN Y ESCANEADO DE MICROMATRICES.....	30
RT-PCRq EN TIEMPO REAL .....	33
<b>1.3. RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
EFECTO DEL TRATAMIENTO HORMONAL SOBRE LOS OVARIOS EMASCULADOS .....	34
ANÁLISIS DE MICROMATRICES .....	35
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS ANTISENTIDO DEL GEN <i>SlDELLA</i> .....	41
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO Y METABOLÓMICO DE PERICARPO DE FRUTOS DE TOMATE EN PROCESO DE MADURACIÓN.....	44
<b>1.4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>50</b>
<b>ANEXO I</b> .....	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>75</b>
<b>CREACIÓN DE UN CONJUNTO DE HERRAMIENTAS BASADAS EN EL SISTEMA “MULTISITE GATEWAY” PARA LA EXPRESIÓN Y SILENCIAMIENTO ARN “HAIRPIN” DIRIGIDOS EN FRUTO DE TOMATE</b> .....	<b>75</b>
<b>2.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>75</b>
PROMOTORES DE TOMATE UTILIZADOS EN BIOTECNOLOGÍA .....	75
EL SISTEMA DE CLONAJE GATEWAY .....	76
EXPRESIÓN TRANSITORIA DE GENES EN PLANTA.....	77
<b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>80</b>
AISLAMIENTO DE PROMOTORES Y TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS .....	80
ANÁLISIS TRANSITORIO DE LOS PROMOTORES .....	80
CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDOS MULTISITE PRO .....	81
CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA ESTRATEGIAS DE SILENCIAMIENTO DIRIGIDO ARNi “HAIRPIN” .....	82
ENSAYOS DE DETECCIÓN DE ACTIVIDAD GLUCURONIDASA .....	83
<b>2.3. RESULTADOS</b> .....	<b>84</b>
AISLAMIENTO DE NUEVOS PROMOTORES DE FRUTO .....	84
CARACTERIZACIÓN DE LOS NUEVOS PROMOTORES DE TOMATE .....	85
CONSTRUCCIÓN DE UN KIT DE EXPRESIÓN BASADO EN EL SISTEMA MULTISITE-GATEWAY.....	91
ADAPTACIÓN DE LA COLECCIÓN DE PROMOTORES A SISTEMAS DE ARNiHP .....	92
<b>2.4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>95</b>

<b>ANEXO II</b> .....	<b>99</b>
<b>CAPITULO 3</b> .....	<b>105</b>
<b>IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN TRANSCRIPTÓMICA DE UN NUEVO TIPO CELULAR O ESTADÍO TRANSCRIPTÓMICO, QUE EXHIBE UN PATRÓN PUNTEADO DE EXPRESIÓN DEL PROMOTOR PFF EN EL PERICARPO Y CUYA PREVALENCIA AUMENTA CON LA MADURACIÓN DEL TOMATE</b> .....	<b>105</b>
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>105</b>
TRANSPORTE DE SACAROSA EN PLANTAS.....	105
METABOLISMO DE SACAROSA EN EL DESARROLLO DEL FRUTO DE TOMATE.....	106
<b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>109</b>
MATERIAL BIOLÓGICO.....	109
AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE FRUTO DE TOMATE.....	109
EXTRACCIÓN DE ARN DE PROTOPLASTOS E HIBRIDACIÓN DE MICROMATRICES.....	110
TINCIÓN PARA LA DETECCIÓN DE GRANOS DE ALMIDÓN.....	111
<b>3.3. RESULTADOS</b> .....	<b>112</b>
CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GUS DIRIGIDO POR EL PROMOTOR PFF.....	112
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE PROTOPLASTOS CON ACTIVIDAD DEL PROMOTOR PFF.....	113
<b>3.4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>120</b>
<b>ANEXO III</b> .....	<b>124</b>
<b>CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 1</b> .....	<b>127</b>
<b>CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 2</b> .....	<b>128</b>
<b>CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO 3</b> .....	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>133</b>



## RESUMEN

La capacidad de las hormonas vegetales, fundamentalmente auxinas y giberelinas, de inducir el desarrollo del fruto en tomate es bien conocida y utilizada desde hace tiempo e implica su intervención como elementos de señalización que median entre el proceso de fertilización y el posterior desarrollo del fruto.

Con objeto de averiguar qué genes están involucrados en el proceso formación del fruto de tomate mediado por hormonas, se realizó un análisis transcriptómico comparativo del desarrollo temprano tanto de frutos fertilizados, como de ovarios inducidos a fructificar mediante tratamiento hormonal. El análisis de los resultados reveló que los transcriptomas presentan las mayores diferencias en los primeros días tras la inducción, probablemente debido a la mayor rapidez de las auxinas en estimular la fructificación. Posteriormente, los transcriptomas se van acercando gradualmente entre ellos con independencia del estímulo hormonal inductor. El estudio reveló que existen elementos que configuran los programas de desarrollo del fruto tanto en una componente general independiente del agente inductor, como en la componente específica de la hormona. Además, en el caso específico de giberelinas, el estudio transcripcional de frutos silenciados en el gen *SIDELLA* mostró que este represor controla al menos una parte de la respuesta transcripcional a esta hormona en el fruto. Esta respuesta parece incluir una serie de mecanismos de defensa que se activan en los ovarios alrededor de antesis. Por otra parte, el estudio transcriptómico y metabolómico del pericarpo de los frutos inducidos por tratamiento hormonal en fase de maduración reveló que el efecto del tratamiento hormonal inductor afecta la expresión de genes relacionados con la síntesis de etileno como los que codifican la expresión de ACC sintetas y ACC oxidasas y da lugar a frutos con alteraciones importantes en la expresión de genes del metabolismo de azúcares como los que codifican sacarosa sintasa y varios enzimas de la glicólisis.

Además, y con objeto de ampliar el rango de herramientas disponibles para ingeniería genética en frutos, se aprovechó el análisis de micromatrices para identificar genes de expresión específica en el ovario/fruto y se clonaron sus secuencias promotoras. Así se pudo construir una colección de vectores Gateway pENFRUIT con los que poder dirigir la expresión o el silenciamiento de un gen específicamente en diferentes fases del desarrollo del fruto de tomate.

Una de las secuencias promotoras aisladas, PFF (3232 pb), mostró un perfil de actividad bifásico durante el desarrollo del fruto: un pico de actividad al principio de la fase III y otro en la fase IV. El patrón espacial punteado en esta última fase de actividad sugirió la existencia de un tipo celular (PPF(+)) o estadio transitorio específico asociado a la actividad del promotor PFF. El análisis transcriptómico de protoplastos PFF(+), reveló que este tipo celular o estadio transcriptómico, se define por un programa de expresión génica caracterizado por una mayor expresión de genes relacionados con la síntesis o aprovechamiento de sacarosa, y por una menor actividad de síntesis de proteínas y remodelación de la cromatina.

## ABSTRACT

The ability of plant hormones, mainly auxins and gibberellins, to induce fruit development in tomato is well known and has been used for some time and implies a role as signaling elements that mediate between the process of fertilization and subsequent fruit development.

To find out which genes are involved in tomato fruit set mediated by hormones, we performed comparative transcriptomic analysis of early development of both fertilized fruits and ovaries induced by hormone treatment to fruition. The analysis of the transcriptome results revealed that the greatest differences occur in the first days after induction, probably due to the higher speed of auxin to stimulate fruit set. Subsequently, the transcriptome of each treatment gradually come closer each other regardless of hormonal treatment or fertilization. The study revealed that there are elements that shape development programs in both a general component independently of the inducing agent, and a specific component of the hormone. Furthermore, in the specific case of gibberellins, the transcriptional study of *SIDELLA* gene silenced fruits, showed that this repressor controls at least a fraction of the transcriptional response to this hormone in the fruit. This response appears to include a series of defense mechanisms that are activated in the ovaries around anthesis. Moreover, transcriptomic and metabolomic study of the ripening pericarp of the fruit induced by hormone treatment, revealed that the effect of hormone treatment affects the expression of genes related to ethylene synthesis such as those that control the expression of ACC synthase and ACC oxidase, and results in fruit with significant alterations in the expression of genes involved in sugar metabolism such as sucrose synthase and those that encode several enzymes of glycolysis.

Besides, in order to extend the range of tools available for genetic engineering of fruit, a microarray analysis was carried out to identify specific gene expression in the ovary/fruit in order to clone fruit specific promoter sequences. Thus it was possible to build a collection of pENFRUIT Gateway vectors for a specifically-directed gene expression or silencing at different stages of tomato fruit development.

One of the isolated promoter sequences, PFF (3232 bp) showed a biphasic activity profile during fruit development: a peak of activity at the beginning of phase III and another at phase IV. The dotted spatial pattern in the late phase of activity, suggested the existence of a cell type (PPF (+)) or transcriptomic stage, associated with the fruit specific PFF promoter activity. Transcriptomic analysis of protoplasts PFF (+), revealed that this cell type or stage is defined by a gene expression program characterized by the increased expression of genes related to synthesis or management of sucrose, and decreased activity of protein synthesis and chromatin remodeling.

## RESUM

La capacitat de les hormones vegetals, fonamentalment auxines i giberelines, d'induir el desenvolupament del fruit de la tomata és ben coneguda i utilitzada des de fa temps i implica la seva intervenció com a elements de senyalització que actuen entre el procés de fertilització i el posterior desenvolupament del fruit.

A fi d'esbrinar quins gens estan involucrats en el procés de formació del fruit de la tomata mediat per hormones, es va realitzar un anàlisi transcriptòmic comparatiu del desenvolupament primerenc tant de fruits fertilitzats, com d'ovaris induïts a fructificar mitjançant tractament hormonal. L'anàlisi dels resultats va revelar que els transcriptomes presenten les majors diferències en els primers dies després de la inducció, probablement a causa de la major rapidesa de les auxines a estimular la fructificació. Posteriorment, els transcriptomes es van apropant gradualment entre ells amb independència de l'estímul hormonal inductor. L'estudi va revelar que hi ha elements que configuren els programes de desenvolupament del fruit tant en una component general independent de l'agent inductor, com en la component específica de l'hormona. A més, en el cas específic de giberelines, l'estudi transcripcional de fruits silenciats en el gen *SIDELLA* va mostrar que aquest repressor controla almenys una part de la resposta transcripcional a aquesta hormona en el fruit. Aquesta resposta sembla incloure una sèrie de mecanismes de defensa que s'activen en els ovaris al voltant de l'antesi. D'altra banda, l'estudi transcriptòmic i metabòlic del pericarp dels fruits induïts per tractament hormonal en fase de maduració va revelar que l'efecte del tractament hormonal inductor afecta l'expressió de gens relacionats amb la síntesi d'etilè com els que codifiquen l'expressió de ACC sintasa i ACC oxidases i dona lloc a fruits amb alteracions importants en l'expressió de gens del metabolisme de sucres com els que codifiquen la sacarosa sintasa i diversos enzims de la glicòlisi.

A més, i per tal d'ampliar el rang d'eines disponibles per a enginyeria genètica en fruits, es va aprofitar l'anàlisi de micromatrius per identificar gens d'expressió específica en l'ovari/fruit i es van clonar les seues seqüències promotores. Així es va poder construir una col·lecció de vectors Gateway pENFRUIT amb els quals poder dirigir l'expressió o el silenciament d'un gen de manera específica en diferents fases del desenvolupament del fruit de la tomata.

Una de les seqüències promotores aïllades, PFF (3232 pb), va mostrar un perfil d'activitat bifàsic durant el desenvolupament del fruit: un pic d'activitat al principi de la fase III i un altre a la fase IV. El patró espacial puntejat en aquesta última fase d'activitat, va suggerir l'existència d'un tipus cel·lular (PPF (+)) o estadi transitori específic associat a l'activitat del promotor PFF. L'anàlisi transcriptòmic de protoplasts PFF (+), va revelar que aquest tipus cel·lular o estadi transcriptòmic, es defineix per un programa d'expressió gènica caracteritzat per una major expressió de gens relacionats amb la síntesi o aprofitament de sacarosa, i per una menor activitat de síntesi de proteïnes i remodelació de la cromatina.



## **Introducción**



## INTRODUCCIÓN GENERAL

El tomate se ha convertido en un sistema modelo para el estudio del desarrollo y maduración del fruto debido a (i) el desarrollo y caracterización de amplias poblaciones de mutantes (Dellapenna et al., 1987; Giovannoni, 2007; Mazzucato et al., 1998), (ii) la disponibilidad de herramientas genómicas, incluidas colecciones de ESTs (<http://solgenomics.net/>), mapas genéticos (Causse et al., 2004; Yamamoto et al., 2005), (iii) eficiente transformación genética (Ellul et al., 2003) y otros métodos transitorios de evaluar función génica (Orzaez et al., 2006), y (iv) existencia de repositorios con centralización de información (Mueller et al., 2005).

El fruto de tomate es un órgano complejo integrado por dos o más carpelos separados por un tejido dispuesto de forma radial llamado septo (Figura IG1A), formado por tejido parenquimático y que resulta de la fusión de dos paredes adyacentes del carpelo (Lemaire-Chamley et al., 2005). Los septos de los carpelos dividen el ovario y el fruto en dos o más lóculos. Durante el desarrollo del fruto, la pared del ovario se convierte en el **pericarpo**, que consta de tres capas distintas: el endocarpo, mesocarpo y exocarpo (Gillaspy et al., 1993).

El **exocarpo** está cubierto en el exterior por una cutícula delgada que se espesa a medida que el fruto se desarrolla cubriéndose por una capa de epidermis y tres ó cuatro capas de tejido colenquimático. Las células de la epidermis exterior están desprovistas de estomas y contienen poco almidón, pero las células del pericarpo interior contienen numerosos granos de almidón. En tomate, las células que contribuyen a la formación de los carpelos y pericarpo del fruto son grandes y vacuoladas, y son morfológicamente similares a las células en empalizada de la hoja. Estas células contienen una gran cantidad de cloroplastos que le dan al fruto en desarrollo su apariencia verde. Las células en la capa epidérmica externa e interna son pequeñas y tienen menos cloroplastos. El **mesocarpo** está compuesto principalmente por células parenquimáticas, que son de mayor tamaño en la región central y cuyo tamaño disminuye hacia la epidermis o los lóculos. El **endocarpo** rodea los lóculos y está formado por una única capa de células (Figura IG1B).

El pericarpo encierra la cavidad locular que contiene las semillas unido a un eje central parenquimatoso o **columela** que suele estar menos pigmentado que otros tejidos. Después de la fertilización de los óvulos, la parte periférica de la columela, o tejido de la placenta, se desarrolla en un tejido (llamado **tejido locular** o gel) que finalmente rodea las semillas y rellena la cavidad locular (Gillaspy et al., 1993; Lemaire-Chamley et al., 2005). Durante las primeras etapas de la fase de expansión, las capas de células externas del pericarpo (más pequeñas) continúan dividiéndose, mientras que las células internas del pericarpo sufren un proceso de expansión. Este paso de expansión celular ocurre también en el tejido locular que llega a adquirir una textura gelatinosa en el fruto maduro (Lemaire-Chamley et al., 2005).

De acuerdo con consideraciones de carácter fisiológico y de ciclo celular, el desarrollo del fruto se ha dividido en cuatro fases (Gillaspy et al., 1993; Srivastava and Handa, 2005) que se suceden a lo largo de un periodo de 40-70 días desde la fertilización al estadio de fruto rojo maduro (Figura IG2A).

La fase I corresponde al desarrollo floral y en ella el primordio reproductivo se diferencia en un carpelo completamente desarrollado. Esta fase es mitóticamente activa y termina cuando la flor alcanza el estadio de antesis, coincidiendo con una parada en las actividades de ciclo celular. La fertilización desencadena una nueva oleada de divisiones celulares que dura 7-14 días dependiendo de la variedad (dando lugar a la fase II); durante esta fase el crecimiento del fruto es lento, alcanzando solamente el 10% del peso fresco final. A continuación, un cambio progresivo de mitosis a expansión celular define la fase III, que se extiende de 3-5 semanas hasta el estadio de fruto verde maduro en la que se llega al tamaño final del fruto (Figura IG2C). El tomate es un fruto climatérico: una vez alcanzado el tamaño máximo, entra en la fase IV, en la que se produce un aumento de la respiración y de síntesis de etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), que induce los cambios fisiológicos y bioquímicos que le dan al fruto el atractivo necesario para facilitar su dispersión, incluyendo cambios en el color, sabor, textura, etc. Varios estudios (Giovannoni, 2001) demuestran que las señales debidas al etileno en frutos climatéricos tienen un papel importante en la coordinación de los procesos moleculares que ocurren durante la maduración. Esto es debido, en parte, al control que esta hormona ejerce sobre los genes implicados en la ejecución de los cambios metabólicos asociados con este proceso (Dellapenna et al., 1987).

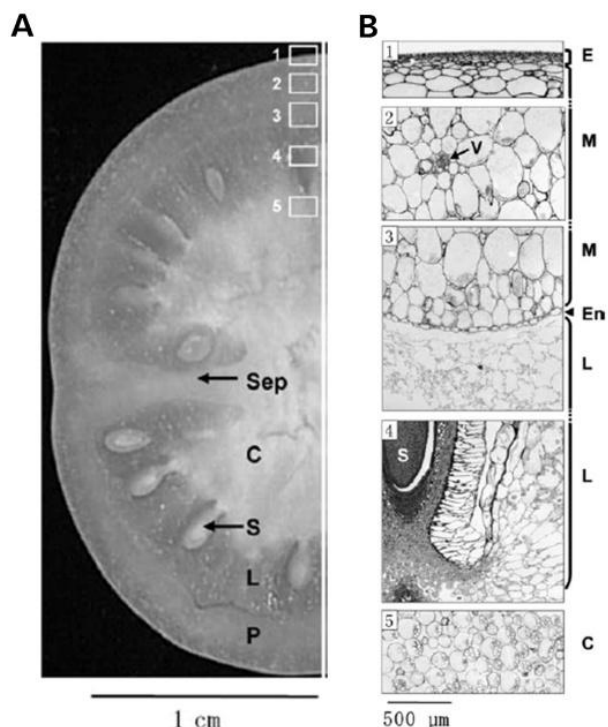


Figura IG1. Estructura del fruto de tomate. (A) Mitad de un corte transversal de un fruto de la variedad Ferum. (B) Secciones de tejido correspondientes a las partes numeradas en (A) de un fruto de 25 dpa. P, Pericarpo; Sep, septo; E, exocarpo; M, mesocarpo; En, endocarpo; L, tejido locular; S, semilla; C, columela; V, haces vasculares. Adaptado de Lemaire-Chamley et al., 2005.



La secuenciación de cualquier genoma produce la necesidad de definir el papel de cada gen, y de comprender las interacciones entre los grupos de genes de dicho genoma (Yang and Speed, 2002). La principal aplicación del uso de micromatrices (Figura IG3) es la de monitorizar la expresión génica (abundancia de ARNm). El grupo de genes que son expresados o transcritos a partir de ADN, denominados “perfil de expresión” o “transcriptoma” es determinante en el fenotipo y función celular. La transcripción de ADN genómico a ARNm es el primer paso en el proceso de síntesis proteica, y diferencias en la expresión génica son responsables tanto de las diferencias morfológicas como fenotípicas así como indicativas de respuestas celulares a estímulos ambientales y perturbaciones (Lockhart and Winzeler, 2000; Yang and Speed, 2002).

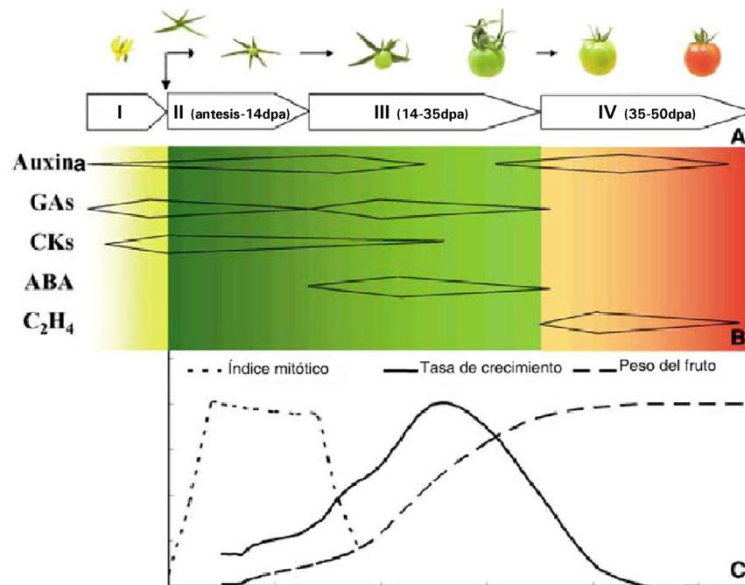


Figura IG2. Regulación hormonal del desarrollo del fruto. (A) Representación de las fases del desarrollo del fruto en días después de la antesis (dpa): I, desarrollo floral y iniciación de la fructificación; II, división celular durante el desarrollo temprano del fruto; III, expansión celular y crecimiento del fruto, y IV maduración del fruto. (B) Esquema de los flujos hormonales según Gillasp y otros 1993. (C) Curvas de crecimiento, índice mitótico y tasa de crecimiento del fruto de tomate. Adaptado de Srivastava, 2005.

El estudio del desarrollo del fruto de tomate mediante el análisis de micromatrices ha ayudado a desentrañar interacciones que regulan diversos aspectos del mismo a nivel transcriptómico (Alba et al., 2004; Lemaire-Chamley et al., 2005; Vriezen et al., 2008). Un ejemplo es el de la caracterización del mutante *Nr* (Never ripe), cuyo resultado fue el descubrimiento de 869 genes que se regulan de manera diferencial durante el desarrollo del pericarpo, 37% de ellos relacionados con etileno (Alba et al., 2005). El gen *Nr* codifica un receptor de etileno de forma que la pérdida de función de este gen previene la maduración del fruto por insensibilidad a etileno incluso cuando el mismo es aplicado de manera exógena. El análisis de micromatrices determinó que el etileno, a través de este receptor, influye en el control transcripcional de genes asociados al metabolismo de carotenoides, acumulación de ascorbato, textura del fruto, aroma y síntesis de etileno (Alba et al., 2005).

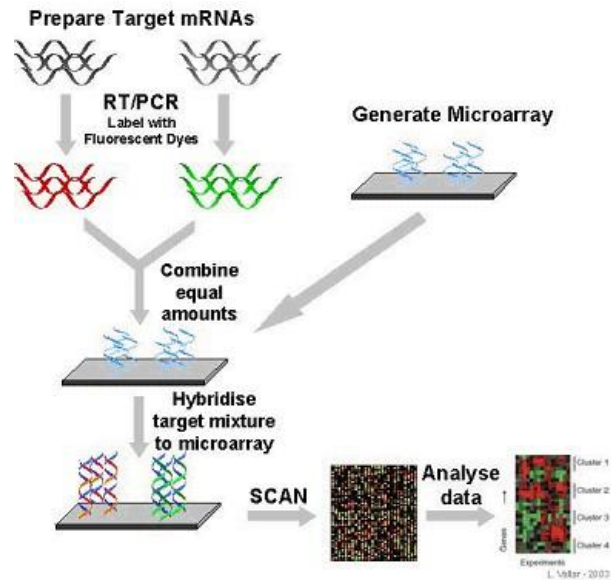


Figura IG3. Esquema de la hibridación de una micromatriz. En esta técnica, el ARN procedente de dos muestras es marcado con dos fluoróforos diferentes (generalmente cianina 3 de color verde y cianina 5 de color rojo), antes de ser hibridado en una matriz formada por una determinada cantidad de ADNc/oligonucleótidos dispuestos en un cristal del tamaño de un portaobjetos. La intensidad de las señales de emisión fluorescentes es proporcional a los niveles de transcritos en las muestras biológicas.

La información que puede aportar el estudio transcriptómico con micromatrices sobre un sistema biológico queda patente en este trabajo, en el que se planteó estudiar el transcriptoma del fruto del tomate en desarrollo, a partir del cual, se obtuvieron herramientas de interés biotecnológico.

## OBJETIVOS

- 1) **Caracterizar, a nivel transcriptómico, el efecto inductor de giberelinas y auxinas en el desarrollo temprano del fruto de tomate.**
- 2) **Determinar el efecto de los diferentes tratamientos inductores (auxinas, giberelinas y polinización), sobre el transcriptoma y el metaboloma del pericarpo del fruto maduro.**
- 3) **Aislar y caracterizar, a partir de la nueva información transcriptómica generada en los objetivos 1 y 2, nuevos promotores con actividad preponderante en fruto.**
- 4) **Diseñar y generar una nueva colección combinatorial de vectores de expresión y silenciamiento en fruto, que incorpore, entre otras, las nuevas secuencias promotoras aisladas en el objetivo 3.**

**Durante el transcurso de la caracterización de nuevos promotores con actividad preponderante en fruto (objetivo 3), se planteó un objetivo adicional:**

- 5) **Caracterizar de forma detallada a nivel transcriptómico un nuevo tipo celular definido por la actividad de uno de los promotores aislados en el objetivo 3.**



## Capítulo 1



## Capítulo 1

### Estudio transcriptómico/metabolómico del desarrollo partenocárpico del fruto inducido mediante vía hormonal en *Solanum lycopersicum*

#### 1.1. Introducción

##### Papel de las hormonas en la inducción de la fructificación

Según el modelo actual, la fructificación se iniciaría normalmente en respuesta a señales hormonales, generadas durante la polinización y la fertilización, y que en principio estarían vinculadas a la formación inicial de la semilla. La acción coordinada de señales producidas entre otros tejidos en las anteras (Marti et al., 2007; Schijlen et al., 2007), y posteriormente por el óvulo fertilizado, conducirían al crecimiento y desarrollo del fruto. La utilización del conocimiento de la acción hormonal, fundamentalmente del relacionado con auxinas y GAs, en la inducción y desarrollo del fruto (por ejemplo el requerimiento de GAs y auxinas) ha permitido en algunas especies vegetales, entre ellas el tomate, producir plantas cuyos frutos se desarrollan en ausencia de polinización/fertilización, fenómeno conocido como **partenocarpia**. La planta de tomate muestra ocasionalmente partenocarpia facultativa, lo que implica el desarrollo del ovario a fruto sin la formación de semillas, en ausencia de fertilización o por aborto de las mismas. Como muchos otros caracteres de interés, la partenocarpia ha sido objeto de estudio y los mejoradores de caracteres agronómicos han intentado identificar fuentes de partenocarpia natural entre especies relacionadas, por ejemplo en el caso del tomate *S. habrochaites*, mediante el análisis de los genes asociados a este carácter o QTLs (Gorguet et al., 2008). Las fuentes de partenocarpia se conocen como: *Pat* Soressi o Montfavet 121, *pat-2* de Severianin, *pat-3 pat-4* de RP75/59 y *pat4.1 pat4.2* y *pat5.1* en IVT-1/ IL5-1. Se desconoce cuál es la base molecular o el gen mutado en ninguno de esos casos, pero el fenotipo partenocárpico de *pat-2*, *-3* y *-4* se ha especulado que se debe a aumentos en el nivel de GAs según se desprende de las alteraciones detectadas en estos fondos mutantes (Fos et al., 2000; Fos et al., 2001). El análisis de los QTLs de partenocarpia en tomate ha permitido identificar al gen *SIARF8* como uno de los posibles causantes de este rasgo en al menos dos de ellos (*pat 4.1-pat4.2*) (Gorguet et al., 2008). Este gen codifica una proteína que inhibe el desarrollo del fruto en *Arabidopsis thaliana* y tomate (Goetz et al., 2007; Goetz et al., 2006) (ver más adelante).

La participación de las hormonas vegetales en el proceso de desarrollo del fruto es consistente con (1) la evolución del contenido de las mismas en los estadíos alrededor de la antesis (Gillaspy et al., 1993; Serrani et al., 2007) y la abundancia relativa entre ellas en determinados estadíos tardíos del desarrollo del fruto, (2) la capacidad de desarrollar frutos partenocárpicos tras la aplicación exógena de hormonas en ovarios emasculados o con óvulos abortados (García-Martínez y Carbonell 1980) o mediante ingeniería genética (Rotino et al. 1997), y (3) los altos niveles de fitohormonas detectadas en mutantes partenocárpicos (Fos et al., 2000).

### Auxinas

El nombre auxina significa en griego 'crecer' y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación de las células. En el siglo XIX Theophyl Ciesielski demostró que un estímulo transmitido desde el ápice era el responsable del crecimiento de la raíz pero fue Fritz Went en 1926 quien a partir de la avena aisló esta molécula promotora del crecimiento (revisado en Azcón Bieto and Talón, 2008; Kende and Zeevaart, 1997).

La auxina principal presente en la mayoría de las plantas es el ácido indol-3-acético (IAA). Existen otros compuestos con actividad auxínica en las plantas, como el ácido 3-índol-butírico, ácido fenil-acético y 4-cloro-indol-acético, pero se conoce poco su papel fisiológico.

El IAA es activo en cantidades muy pequeñas y está asociado a una gran variedad de procesos fisiológicos que van más allá del efecto sobre la elongación, incluyendo la dominancia apical, tropismos, elongación del tallo, fructificación, inducción de la división/diferenciación celular en el cambium, iniciación de la raíz y promoción de la biosíntesis del etileno (Azcón Bieto and Talón, 2008; Kende and Zeevaart, 1997). Existen, además, auxinas sintéticas como el ácido 2.4-diclorofenoxiacético (2.4-D) y ácido naftalen-1-acético, que son comúnmente utilizados para inducir el enraizamiento y promover el cuajado y desarrollo del fruto.

### *Biosíntesis de auxinas*

Se han descrito varias rutas de biosíntesis de IAA en plantas y el precursor principal puede depender de la especie vegetal. Un ejemplo es el indol-3-acetonitrilo que es característico en crucíferas. (Kende and Zeevaart, 1997; Woodward and Bartel, 2005). Experimentos genéticos y bioquímicos han demostrado la existencia de al menos dos rutas, una ruta triptófano-dependiente y otra independiente de triptófano.

La situación parece ser incluso más compleja, ya que se han propuesto varias rutas dependientes de triptófano denominadas según el intermediario: la ruta del ácido indol-pirúvico (IPA), la de la indol-3-acetamida (IAM), la ruta de la triptamina, y la ruta del indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Figura 1.1).

La ruta dependiente de triptófano más habitual en las especies vegetales es la del ácido indol-pirúvico (ruta IPA), en la que se produce la transaminación del triptófano para producir ácido-3-pirúvico (IPA) por la acción de una triptófano aminotransferasa. A continuación, IPA se descarboxila por medio de la enzima ácido indol-3-pirúvico descarboxilasa para dar lugar al indol-3-acetaldehído (IAAld); la oxidación del aldehído a ácido produce IAA en una reacción catalizada por la indol-3-acetaldehído oxidasa. Recientemente, la caracterización de mutantes de *A. thaliana* para el estudio de la interacción etileno-auxinas a nivel tisular, y de los mutantes *sav3* llamados mutantes del SAS (de "shade avoidance syndrome"), incapaces de elongar sus tallos en condiciones de luz de baja intensidad, han permitido la identificación de la enzima triptófano aminotransferasa1 (TAA1), que al parecer sería la implicada en la formación de ácido-3-pirúvico (IPA) a partir de triptófano (Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008).



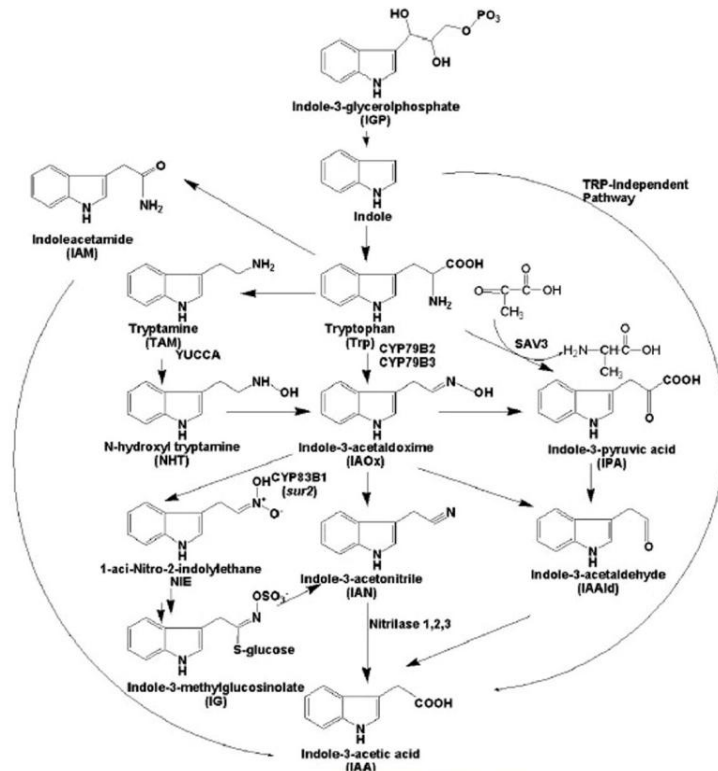


Figura 1.1. Diagrama que muestra las posibles rutas de biosíntesis de IAA sugeridas. De Tao et al. 2008.

La triptamina producida por descarboxilación del triptófano puede dar lugar también al IAA a través de la formación del intermediario indol-3-acetaldoxima (IAOx). La identificación de *yucca*, un mutante que acumula IAA sugiere que esta ruta de la triptamina puede darse en varias especies de plantas. El fenotipo de *yucca* deriva de la sobre-expresión de una enzima parecida a la flavin monooxigenasa (FMO) que oxida triptamina a N-hidroxinil-triptamina (NHT) *in vitro* (Woodward and Bartel, 2005).

Igualmente, la indol-3-acetaldoxima (IAOx) puede derivar de la descarboxilación oxidativa del triptófano y puede dar lugar a IAA a través de dos intermediarios principales: el indol-3-acetaldehído (IAAld) y el indol-3-acetonitrilo (IAN) que es convertido a IAA por la enzima nitrilasa. El triptófano también puede dar lugar a IAA a través de la ruta de la indol-3-acetamida (IAM) mediante la acción enzimática de una IAM hidrolasa.

El hecho de que mutantes deficientes en triptófano acumularan IAA (mutantes *trp2* y *trp3* en *A. thaliana*) sugirió una ruta alternativa triptófano-independiente en la que el IAA sería sintetizado a partir de indol o indol-glicerol fosfato (Woodward and Bartel, 2005).

### Señalización y papel de las auxinas en la fructificación

La presencia de auxinas en el polen, su síntesis en el estilo y el ovario acompañando al crecimiento del tubo polínico y por lo tanto paralelo a la fertilización, son factores indicativos de la función de esta hormona durante el inicio de la fructificación (Chen and Zhao, 2008; Ozga and Reinecke, 2003). Además, es sabido que la aplicación exógena de auxinas estimula el

crecimiento del ovario y la formación de frutos partenocárpicos (Alabadi et al., 1996). En frutos de tomate en desarrollo, la actividad endógena de las auxinas sigue un patrón bimodal (Figura IG2B) con picos de actividad sobre los 10 días post-antesis (dpa) y a continuación, otro sobre los 30 dpa, lo que sugiere un papel de estas hormonas en el inicio de la fase de expansión (fase III) y al final del desarrollo embrionario (fase IV) (Gillaspy et al., 1993).

#### *Regulación de la acción de las auxinas en el fruto de tomate*

Según el modelo desarrollado a partir de los estudios en *Arabidopsis*, la respuesta celular a las auxinas depende del reclutamiento de una serie de factores de transcripción responsables de la activación de los genes relacionados con la respuesta final a auxinas (ARFs). Los AUX/IAA son represores de la acción de los ARFs de vida media corta que interaccionan formando homo/heterodímeros entre ellos y con los ARFs. Así mismo, los ARFs son activadores/represores transcripcionales que se unen a elementos de respuesta a auxinas TGTCTC presentes en los promotores de genes de respuesta temprana, incluidos los propios AUX/IAA. Se sabe que tanto los AUX/IAA como los ARF están representados por pequeñas familias génicas con distintos patrones espacio-temporales de expresión lo que sugiere su participación en las respuestas a auxina de diferentes órganos, tejidos y procesos de desarrollo. Distintos elementos de la respuesta a auxinas parecen ser determinantes para el desarrollo del fruto en tomate. Así, la regulación negativa de la expresión de un gen *AUX/IAA* de tomate, el *SIIAA9*, mediante ingeniería genética (Wang et al., 2005), produce plantas que inducen el desarrollo temprano de frutos incluso antes de la fertilización, dando lugar a frutos partenocárpicos, indicando que este elemento de la señalización funciona reprimiendo la fructificación en respuesta a auxinas. El fruto partenocárpico resultante es normal en tamaño, con buen desarrollo de la placenta y del tejido intralocular, mostrando un mayor contenido en sólidos solubles. La participación de otros elementos relacionados con auxinas en el desarrollo del fruto es sugerida por el éxito en la producción biotecnológica de frutos partenocárpicos que utiliza el factor de respuesta a auxina ARF8 y que también parece funcionar como represor de la iniciación de la fructificación. En relación con ello, parece ser que en tomate se producen dos formas de *SIARF8* que corresponden a dos versiones de "splicing" del mismo gen. Los transcritos aberrantes de *AtARF8-4* introducidos interferirían con la formación o con la función del complejo en el que intervendría ARF8 para reprimir la fructificación (Goetz et al., 2007; Goetz et al., 2006).

Los dos ejemplos anteriores se apoyan en el modelo actual de respuesta a auxinas, particularizado en el contexto del fruto, según el cual hasta la antesis, el programa de desarrollo en fruto se encuentra bloqueado a nivel molecular por un complejo formado por AUX-IAA/ARFs (en el que podrían participar al menos IAA9 y ARF8) que actuaría reprimiendo genes de respuesta a auxinas implicados en poner en marcha el programa de fruto.

La onda de auxinas inducida por la fertilización y generada en el óvulo/semilla o en los tejidos anexos, activaría la degradación del complejo AUX/IAA mediada por el proteosoma de manera que ARF8 junto con otras señales y activadores, pueden estimular la expresión de genes de respuesta a auxinas (Figura 1.2). Los estudios en *Arabidopsis* indican que la expresión de *ARF8* desaparece en los óvulos después de la fertilización indicando que además de degradarse el complejo, dejaría de sintetizarse ARF8 (Goetz et al., 2006). Recientemente, se ha visto que otro gen ARF, el *SIARF7*, tendría una función equivalente a *SIARF8*. El silenciamiento de *SIARF7* da lugar a frutos partenocárpicos, sugiriendo también un papel como regulador negativo del inicio de fructificación (de Jong et al., 2009).

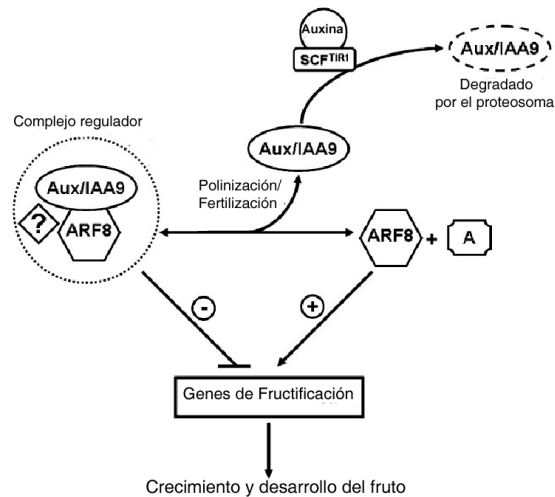


Figura 1.2. Modelo de participación de ARF8 y Aux/IAA9 en el control del inicio de la fructificación y crecimiento del fruto. ARF8 y Aux/IAA9, junto con otras proteínas (?), formarían un complejo regulador que bloquearían de forma directa la transcripción de los genes de inicio de la fructificación, o actuarían indirectamente previniendo el que ARF8 actuara como un activador transcripcional de estos genes. Como consecuencia de la fertilización, la auxina se uniría a su receptor, TIR1, promoviendo la degradación de las proteínas Aux/IAA9 por el proteosoma a través del complejo ubiquitina ligasa SCF<sup>TIR1</sup>. En ausencia de Aux/IAA9, ARF8 junto con activadores adicionales (A) estimularían la expresión de genes de respuesta temprana a auxina, iniciando el crecimiento y desarrollo del fruto (de Goetz, 2007).

### Giberelinas (GAs)

Las GAs se descubrieron en 1935 gracias al estudio de una enfermedad de plantas de arroz llamada "bakanae" (planta loca), causada por el hongo *Gibberella fujikuroi*, que provoca un crecimiento excesivo de los brotes y los tallos en esta especie. Posteriormente, se aisló el compuesto inductor del crecimiento, el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), a partir del filtrado segregado por el hongo (Hedden and Kamiya, 1997; Hedden and Phillips, 2000; Hedden and Proebsting, 1999). Más tarde se comprobó que las plantas también poseen moléculas similares al ácido giberélico (GA) y desde entonces se han aislado y caracterizado 126 GAs en plantas superiores, hongos y bacterias, la mayoría de las cuales son precursores o catabolitos de las rutas de biosíntesis de las GAs y carecen de actividad biológica (Hedden and Phillips, 2000).

Las GAs son ácidos diterpénicos tetracíclicos cuyo esqueleto básico es el ent-giberelano. Este esqueleto puede ser de 20 átomos de carbono (GAs C<sub>20</sub>) o de 19 átomos de carbono (GAs C<sub>19</sub>) (Figura 1.3).

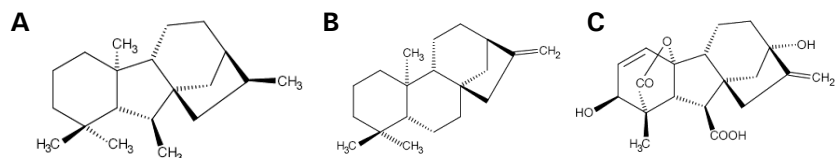


Figura 1.3. Estructura química de las GAs. A) ent-giberelano, B) ent-kaureno y C) GA de 19 átomos de carbono.

Las giberelinas que poseen mayor actividad biológica son las de 19 átomos de carbono con un grupo  $\beta$ -hidroxilo en la posición C-3. Estas GAs son producto del metabolismo de las GAs C<sub>20</sub>, en las que el C-20 se pierde tras su oxidación de grupo metilo (CH<sub>3</sub>) a aldehído (CHO). La inactivación irreversible de las GAs activas (GAs C<sub>19</sub>) se produce mediante la incorporación de un grupo  $\beta$ -hidroxilo en la posición C-2 (Azcón Bieto and Talón, 2008).

### *Metabolismo de la GAs*

La ruta de biosíntesis de GAs ocurre a través de diferentes pasos catalizados por enzimas de distinta localización celular y se puede dividir en tres partes: 1) la biosíntesis de ent-kaureno en los plástidos, 2) la oxidación de ent-kaureno a GA<sub>12</sub> en el retículo endoplasmático y 3) la oxidación en el citoplasma de GA<sub>12</sub> a GAs activas de 19 átomos de carbono o inactivas de 20 átomos de carbono (Hedden and Phillips, 2000).

### Biosíntesis del ent-kaureno

Mientras que en hongos solamente es necesaria la acción de una enzima, en plantas, la formación del ent-kaureno a partir de geranylgeranildifosfato (GGPP) ocurre en los plástidos y requiere la actividad de dos diterpeno ciclasas, una copalil difosfato (CPP) sintetasa (CPS) y ent-kaureno sintetasa (KS) (Hedden and Kamiya, 1997). El GGPP es un precursor de los pigmentos fotosintéticos (carotenoides y de la cadena de fitol de la clorofila) que es sintetizado principalmente en los plástidos (ruta del metileritritol fosfato o MEP) o transportado desde el citoplasma (ruta del mevalonato o MVA). La enzima CPS es un punto de regulación en la síntesis de GAs debido al efecto inhibitorio que el catión Mg<sup>2+</sup> tiene sobre este enzima. La concentración de Mg<sup>2+</sup> se incrementa en los plástidos por efecto de la luz, de esta forma durante la desetilolación, la síntesis de GAs disminuye mientras que se aumenta la producción de pigmentos fotosintéticos a través de un incremento del precursor GGPP (Prisic and Peters, 2007).

### Síntesis de GA<sub>12</sub> por oxidación del ent-kaureno

En la membrana del retículo endoplasmático, el ent-kaureno se convierte en GA<sub>12</sub> mediante una serie de reacciones oxidativas catalizadas por monoxigenasas del citocromo P450. Estas enzimas utilizan NADH y O<sub>2</sub> para oxidar de manera secuencial los carbonos C-19 y C-7 del ent-kaureno para dar lugar a GA<sub>12</sub>.

En algunas especies, la ruta de síntesis de GAs continúa no a partir de GA<sub>12</sub>, sino en forma de GA<sub>53</sub>, debido a que el GA<sub>12</sub> puede ser hidroxilado por enzimas GA 13-oxidasas en el retículo endoplasmático (Hedden and Phillips, 2000). Al parecer en tomate esta ruta sería la más utilizada en el caso del ovario en fase de crecimiento (Fos et al., 2000).

Oxidación de GA<sub>12</sub>

En el citoplasma celular se producen los últimos pasos de la ruta de biosíntesis de GAs. Las enzimas GA 20-oxidasas (GA20ox) oxidan el grupo metilo del C-20 tanto de GA<sub>12</sub> como de GA<sub>53</sub> dando lugar a los intermediarios de 19 carbonos GA<sub>9</sub> o GA<sub>20</sub>. Las enzimas GA 3-oxidasas (GA3ox) actúan sobre GA<sub>9</sub> y GA<sub>20</sub> generando las GAs activas GA<sub>4</sub> y GA<sub>1</sub> respectivamente por introducción de un grupo β-hidroxilo. Estas formas activas pueden ser desactivadas mediante otra β-hidroxilación por enzimas GA 2-oxidasas (GA2ox), generándose respectivamente las formas inactivas GA<sub>34</sub> y GA<sub>8</sub> (Hedden and Phillips, 2000).

Regulación de la biosíntesis de GAs

Los niveles de GAs activas están regulados tanto por factores ambientales (como el fotoperiodo y la temperatura), como endógenos (hormonas). Existe además un mecanismo de regulación basado en la retroalimentación negativa o positiva de los enzimas finales de la ruta, inducida por la respuesta a GA activa (Figura 1.4) (Yamaguchi and Kamiya, 2000). Se había sugerido que la acción de las GAs da lugar a la producción de un represor transcripcional que limitaría la expresión de los genes que codifican enzimas de biosíntesis de GAs (Scott, 1990). El control operaría, al menos en parte, a través de la regulación de los niveles de transcritos de estos enzimas, modulando así la expresión de genes específicos (Hedden and Phillips, 2000).

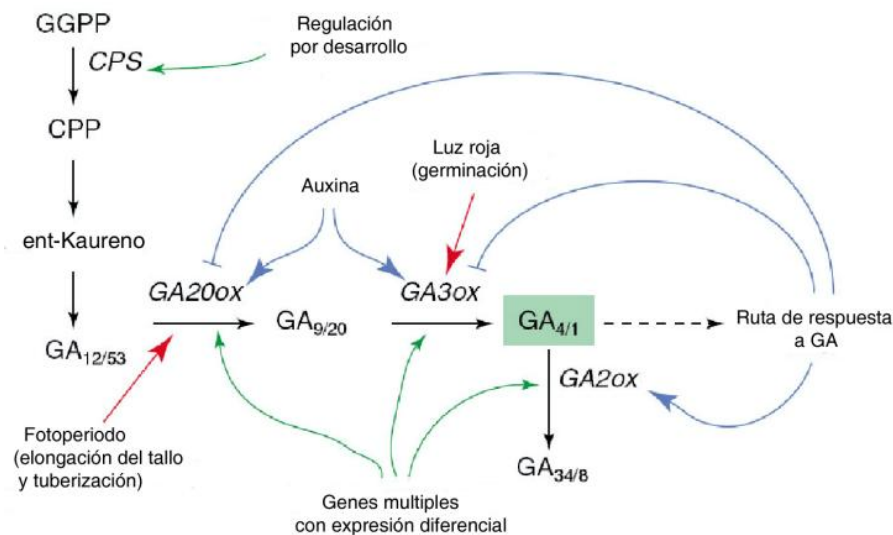


Figura 1.4. Resumen esquemático de los mecanismos que pueden afectar la expresión de genes que codifican enzimas del metabolismo de las GAs. Las flechas azules y rojas indican regulación mediante hormonas y la luz respectivamente, y las flechas indican incremento en la expresión génica, mientras que las barras denotan represión en la expresión. Las GAs biológicamente activas se destacan dentro del cuadro verde. Adaptado de Hedden P. y Philips, 2000.

En particular algunas GA 20-oxidasas y las GA 3-oxidasas están sometidas a una retroalimentación negativa, de manera que la abundancia del producto final (GA<sub>1</sub>/GA<sub>4</sub>) reduce los niveles de transcritos de los enzimas que catalizan la síntesis de GAs activas (Martin et al., 1997; Phillips et al., 1995). Por otro lado, las GA 2-oxidasas están sometidas a una retroalimentación positiva, de forma que el incremento de GAs activas, aumenta la acumulación de los transcritos de esta enzima (Thomas et al., 1999), lo que ayuda a regular la concentración de GAs activas.

### GAs en la inducción de la fructificación

La aplicación exógena de GAs en los ovarios emasculados de las flores de tomate alrededor de la fase de antesis induce la expansión celular en el ovario y conduce al desarrollo de un fruto partenocárpico (Fos et al., 2000). La actividad endógena de las GAs sigue un patrón bimodal (Figura IG2B), con un pico en la fase de ovario en antesis, y después aumentando sobre el día 8 dpa y teniendo otro pico de actividad sobre el día 15 dpa, disminuyendo posteriormente hasta la fase de maduración (Sjut and Bangerth, 1982). Estos dos picos de acumulación de GAs coinciden respectivamente con la fase de división (fase II) y la fase de expansión (fase III) del desarrollo del fruto del tomate (Figura IG2).

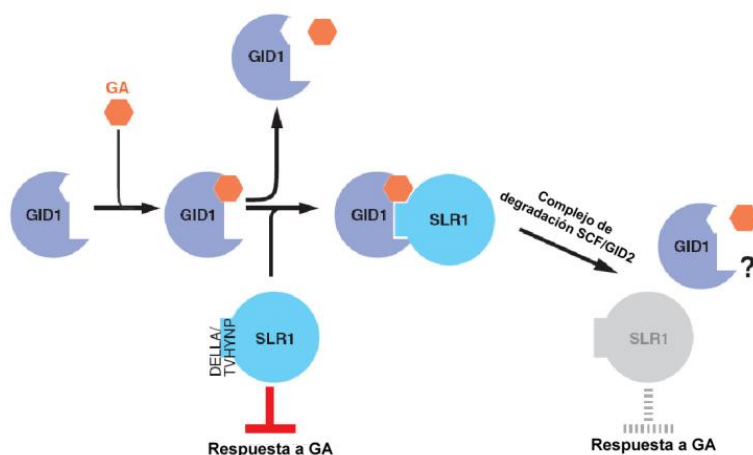


Figura 1.5. Modelo de señalización de las giberelinas en arroz. A concentraciones bajas de GA, SLR1 reprime la respuesta a GAs. A concentraciones altas, un receptor soluble, GID1, se une a la GA; sin embargo la unión es inestable y se produce fácilmente la disociación de los dos elementos. El complejo GID-GA interacciona específicamente con SLR1 en el sitio de los dominios DELLA y TVHYNP. El complejo triple formado por GID1-GA-SLR1 es así más estable. La respuesta a GAs deja de estar reprimida al reconocer SCF<sub>GID2</sub> el complejo y marcar SLR1 para su degradación por el proteosoma 26S. Adaptado de Ueguchi-Tanaka et al., 2007.

La fructificación en tomate está asociada al incremento de la hormona activa GA1 que parece deberse a un mayor nivel transcripcional de los genes que codifican la enzima GA20ox y de la enzima CPS de tomate (codificada por *SICPS*), pero no de la enzima GA3ox, o a una reducción de la GA2ox, que catabolizaría la forma activa (Serrani et al., 2007).

Según el modelo actual del mecanismo de acción de las GAs, estas hormonas funcionarían uniéndose en primera instancia a proteínas receptoras de la hormona, proteínas GIDs, tras lo cual dirigirían la degradación mediada por el proteosoma de unas proteínas llamadas DELLA que actúan como represoras del crecimiento (Figura 1.5).

Las proteínas DELLA pertenecen a una subfamilia de factores de transcripción, dentro de la familia de factores GRAS, y actúan como reguladores negativos de la respuesta a GAs. La estructura de las proteínas DELLA consta de dos dominios: el del extremo C-terminal denominado

dominio GRAS, importante para la función de la proteína y característico de las proteínas que pertenecen a esta familia, y el dominio del extremo N-terminal, denominado DELLA que interviene en la regulación por GAs (Thomas et al., 2005).

Según el modelo actual, la percepción de GAs induce la fosforilación de las proteínas DELLA que son así destinadas a la degradación por el proteosoma 26S. Las proteínas fosforiladas son poliubiquitinadas por un complejo enzimático SCF E3 ubiquitina ligasa, cuya subunidad F-box posee un dominio C-terminal que confiere la especificidad de unión al sustrato que se debe ubiquitinar (Thomas and Sun, 2004)

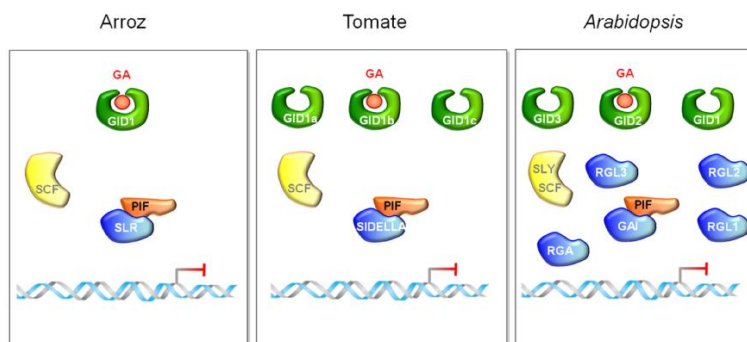


Figura 1.6. Esquema de los componentes que intervienen en la represión/desrepresión del crecimiento mediada por giberelinas en arroz, tomate y *A. thaliana*.

Las proteínas DELLA promueven la transcripción del receptor *GID1* y de forma indirecta regulan la biosíntesis de los genes de respuesta a GAs y control del "feedback". La unión de giberelina a *GID1* aumenta la afinidad de *GID1* hacia las proteínas DELLA. El complejo GA/*GID1*/DELLA adquiere afinidad por la proteína F-Box y las DELLAs son degradadas por el proteosoma. La unión de las proteínas DELLAs a proteínas PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR) integra la respuesta a la luz y la ruta de GAs: las PIF se degradan por la luz, por lo que sólo pueden actuar en ausencia de luz y presencia de giberelinas (Hartweck, 2008).

En arroz, el gen *GID2* codifica la proteína F-box que forma parte del complejo SCF E3 ubiquitina ligasa, mediante el cual se inicia la degradación de la proteína DELLA *SLR1* (Figura 1.5), mientras que en *Arabidopsis* es el gen *SLY1* el que codifica esta proteína. En esta especie, se conocen 5 genes que codifican proteínas DELLAs distintas: *GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2* y *RGL3*; otros genes ortólogos codifican estas proteínas en maíz (*d8*), trigo (*RHT*) y cebada (*SLN1*) (Figura 1.6).

La redundancia funcional en el control del crecimiento en *A. thaliana* es hasta el momento una peculiaridad de las brassicáceas, y con la excepción de *RGL3* las demás proteínas DELLA pueden mostrar funciones solapantes en la represión del crecimiento mediado por giberelinas (Thomas and Sun, 2004). *RGA* y *GAI* son los principales represores que controlan el crecimiento vegetativo y la inducción floral, *RGL2* regula la germinación de la semilla y *RGL1* y *RGL2* junto con *RGA* controlan el desarrollo floral (Dill and Sun, 2001; Lee et al., 2002).

### Mutantes DELLA

La deficiencia en GAs produce un fenotipo enano en la planta, mientras que un exceso en GAs como el producido por un tratamiento exógeno, da lugar a plantas más altas que las plantas

silvestres, lo que demuestra que las GAs son esenciales para el crecimiento de la planta. Este tipo de fenotipos ocurre tanto a nivel de síntesis de GAs como a nivel de señalización, como es el caso de mutantes del gen *GAI* que codifica una de las cinco proteínas DELLA en *A. thaliana*. El mutante *gai* de *A.thaliana* comparte muchas de las características asociadas a mutantes deficientes en GAs, es decir: son plantas enanas, sus hojas son más oscuras que en las silvestres, y en días cortos florecen más tarde que las plantas silvestres. Sin embargo, el fenotipo del mutante *gai* no se revierte mediante la aplicación de GAs, y este tipo de mutantes contienen niveles más elevados de GAs activas que los niveles que se obtienen en plantas silvestres. A diferencia de las mutaciones de deficiencia en GAs, la mutación *gai* es una mutación semidominante y esto es debido a que da lugar a un producto que es estructuralmente y funcionalmente distinto al producto producido por el alelo silvestre. Además en este mutante, los niveles de transcritos correspondientes a los enzimas GA20-oxidasas y del gen *GAI4* (que codifica enzimas que catalizan los últimos pasos en la biosíntesis de GAs), están incrementados en relación a los niveles de la planta silvestre, lo que está en consonancia con la idea de una alteración en el sistema de regulación "feedback" de los niveles de GAs en estas plantas.

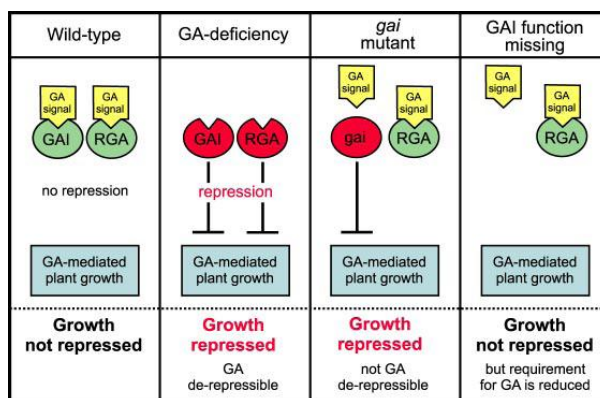


Figura 1.7. Modelo simplificado de des-represión de la regulación del crecimiento en plantas mediada por GA. Las proteínas GAI y RGA reprimen las respuestas mediadas por GAs. El mutante *gai* no reconoce la señal de GA y por lo tanto el gen *gai* actúa como un represor del crecimiento. Cuando se pierde la función del represor, pero RGA está activo, todavía es necesaria la GA para la des-represión del crecimiento, aunque este requerimiento se reduce (de Richards et al., 2001).

En los mutantes de pérdida de función *gai* en los que la función represora de GAI ha desaparecido, se producen fenotipos más altos, característicos de las plantas tratadas de manera exógena con GAs. Estas plantas tienen entrenudos más largos, hojas más estrechas y sus estambres son estériles debido a que la mutación está causando una respuesta a GAs constitutiva (Figura 1.7). En este tipo de mutantes la concentración de GAs es más baja que en la planta silvestre, hay una mayor resistencia a inhibidores de la biosíntesis de GAs y la descendencia de cruces entre estos mutantes y los mutantes *gai* enanos (deficientes o insensibles) da lugar a plantas con fenotipo más alto que el silvestre (Richards et al., 2001).

En el caso del fruto de tomate, el represor *SIDELLA* presenta altos niveles de transcrito al final del desarrollo del ovario del tomate, lo que indica que puede tener un papel en la parada del desarrollo que se observa en el ovario alrededor de la antesis. Las plantas transformadas con el gen antisentido *DELLA* (<sup>as</sup>*SIDELLA*) producen frutos partenocápicos de forma facultativa, las



flores muestran heterostilia lo que impide la autofecundación natural, pero por otra parte el polen y óvulos son completamente fértiles. Los frutos que se desarrollan en ausencia de fertilización son de menor tamaño que los que se obtienen por fertilización. En estas plantas el crecimiento del fruto se encuentra activado desde el principio, sorteándose el requerimiento inicial de auxinas. El hecho de que los frutos sean de menor tamaño y con menos número de células que los fertilizados o los obtenidos mediante auxinas, sugiere un acortamiento de la fase de división celular, pasándose antes a la fase de expansión celular, lo que está de acuerdo con que las GAs podrían actuar en la fructificación aguas abajo de las auxinas (Marti et al., 2007).

### Interacción entre auxinas y GAs

El "cross-talk" entre auxinas y giberelinas se ha descrito a varios niveles, aunque normalmente el estudio se haya restringido al tejido vegetativo y a ciertas etapas del desarrollo inicial de la planta (Weiss and Ori, 2007). En células de la raíz de *A.thaliana* las auxinas promueven la degradación de DELLA en respuesta a GAs (Fu and Harberd, 2003); en tabaco y *Arabidopsis* las auxinas inducen la expresión del gen *GA2Ox* de biosíntesis de GAs (Frigerio et al., 2006). Por lo tanto, las auxinas, además de inducir la síntesis de genes de la ruta de biosíntesis de GAs, estimulan la degradación de las proteínas represoras de la señal de las GAs.

Aunque no se sepa con exactitud cómo se interrelacionan auxinas y giberelinas en su papel regulador durante el desarrollo inicial del fruto, ni su distribución espacio-temporal, etc., ya se sabía que en tomate había dos pulsos de GAs separados por uno de auxinas alrededor y pasado el momento de anthesis (Gillaspy et al., 1993) (Figura IG2).

Los niveles de transcrito del gen *SIARF7* disminuyen después de la polinización o del tratamiento con auxinas, pero se mantienen inalterados después del tratamiento con GAs, lo que sugiere que la acción de las auxinas ocurre antes que la acción de las GAs (de Jong et al., 2009). Recientemente se ha comprobado que las auxinas alteran el metabolismo de las GAs e incrementan los niveles de GA<sub>1</sub> activa en ovarios no polinizados a través de las enzimas de biosíntesis de GAs (CPS, GA20ox y GA3ox), y disminuyendo la expresión de un gen que codifica una enzima GA2ox, lo que sugiere un inicio de fructificación activado por auxinas pero mediado por GAs. Las auxinas podrían tener un efecto adicional a través de la regulación de los genes *Aux/IAA* y *ARF* que explicaría la diferencia morfológica entre frutos inducidos con GAs y frutos polinizados o frutos inducidos con auxinas (Serrani et al., 2008).

### Otras hormonas que intervienen en la fructificación

#### *Citoquininas (CKs)*

Las CKs son abundantes a los 5 días después de anthesis y se ha sugerido un papel de estas hormonas durante la fase de división celular (fase II) (Figura IG2). En tomate, la mayor

concentración de CKs se encuentra en la semilla en fase de desarrollo, que se cree podría activar la síntesis de un regulador positivo que induciría la entrada en fase de división de las células adyacentes. La disminución en los niveles de CKs durante la maduración sugiere un papel menos importante durante esta fase (Gillaspy et al., 1993).

#### *Ácido abscísico (ABA)*

Los niveles de ABA llegan a ser detectables a los 5 días después de la fertilización y aumentan hasta alcanzar un pico en la fase de expansión (fase III), y luego disminuyen siendo detectables hasta los 30-50 días después de la polinización (Figura IG2). Al parecer esta hormona previene la germinación precoz de la semilla en el fruto ya que los mutantes deficientes en ABA muestran en el fruto una frecuencia elevada de germinación del embrión (Gillaspy et al., 1993). La observación de genes sobre-expresados relacionados con la síntesis de ABA antes del inicio de la fructificación, sugiere un papel de ABA en el mantenimiento del ovario y la prevención del desarrollo del fruto antes de la fertilización (Vriezen et al., 2008). Después de la fertilización los niveles de ABA disminuyen, así como los niveles de estos transcritos, y se incrementa la expresión de genes implicados en la degradación de ABA (Nitsch et al., 2009).

#### *Etileno*

El etileno es la hormona más estudiada debido a su papel promotor de procesos de maduración y senescencia. Los niveles de esta hormona son elevados en las fases tempranas del desarrollo del fruto (fase I). Es sabido que la polinización induce temporalmente la biosíntesis de etileno mediante la expresión de un gen ACC sintasa de tomate *SIACS1A* y de los genes *SIACO1* y *SIACO3*, y que la biosíntesis de etileno empieza a disminuir poco después debido a que *SIACO1* y *SIACO3* estarían regulados negativamente por etileno (Llop-Tous et al., 2000). El papel del etileno en estadios más tardíos y en la maduración de frutos climatéricos ha sido objeto de amplio estudio (Giovannoni, 2001).

En este capítulo se ha realizado un análisis transcriptómico de las fases iniciales del desarrollo partenocárpico del tomate inducido mediante tratamiento exógeno con giberelinas o auxinas. La finalidad fue la de identificar genes implicados en el desarrollo del fruto, ya que la acción de fitohormonas (principalmente auxinas y giberelinas) está asociada con la fructificación (Alabadi et al., 1996; Serrani et al., 2007). Los transcriptomas de los frutos inducidos mediante tratamiento, se han comparado con los del fruto fertilizado y el fruto de plantas transgénicas en las que se encontraba silenciado el gen *SIDELLA*. Finalmente, se ha llevado a cabo un estudio transcriptómico y metabolómico del pericarpo de frutos inducidos mediante tratamiento hormonal con la finalidad de determinar el efecto del tratamiento inductor sobre la composición del mismo, y que podría influir sobre algunas de las cualidades organolépticas del fruto maduro.

## 1.2. Materiales y Métodos

### Material biológico

En la parte de inducción partenocárpica, se utilizaron plantas de tomate de la variedad Microtom crecidas en invernadero a una temperatura entre los 20 y 24°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz. Estas plantas crecieron en una mezcla de turba y vermiculita y mediante riego por goteo se les proporcionó solución nutritiva (Hoagland nº 1) con oligoelementos. El día antes de la antesis, algunas flores fueron emasculadas (eliminando las anteras con unas pinzas) y fueron etiquetadas con tal de poder identificar el estadio de las muestras y seguir el desarrollo del ovario/fruto a diferentes tiempos; otras fueron solamente identificadas y etiquetadas sin emasculadas (polinizadas). En el día de la antesis algunas de las flores emasculadas fueron tratadas con 20  $\mu$ l de 0.3 mM GA3 (Fluka, Buchs, Switzerland) o con 20  $\mu$ l de 0.1 mM 2.4-D (Fluka, Buchs, Switzerland) como ya se ha descrito (Alabadi et al., 1996); paralelamente una serie equivalente de ovarios no tratados pero emasculados fueron dejados como control. Algunos de estos ovarios no tratados fueron recogidos el día de la antesis (tiempo cero) como referencia en un estudio temporal ("time course"). El resto de muestras correspondientes a los ovarios etiquetados fueron recogidas a los 2, 5 y 12 días después de antesis, medidos con un calibrador o pie de rey, pesados y congelados en nitrógeno líquido y guardados a -80°C hasta la extracción de ARN.

### Extracción de ARN

En el caso de ovarios en fase de desarrollo temprano, el ARN se extrajo a partir de 0.5 g de ovarios (aproximadamente), utilizando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante y en el que básicamente las muestras fueron lisadas y homogeneizadas en presencia de un tampón que contenía isotiocianato de guanidina y beta-mercaptoetanol.

Se añadió etanol con el fin de mejorar la unión entre el ARN total y una membrana contenida dentro de una columna (RNeasy mini column), a continuación los contaminantes fueron eliminados mediante una serie de lavados y finalmente el ARN se eluyó en 30  $\mu$ l de agua. Para la precipitación del ARN, se añadió acetato sódico 3 M (una décima parte del volumen) y etanol absoluto (2 veces el volumen) y se centrifugaron las muestras durante 30 minutos a 13000 rpm. El precipitado resultante, se secó eliminando la parte acuosa y se realizó un lavado añadiendo 150  $\mu$ l de etanol al 70% y centrifugando a 13000 rpm durante 5 minutos. Por último, se dejó evaporar el etanol residual y se resuspendió el ARN precipitado con 15.5  $\mu$ l de agua MiliQ estéril.

Para ensayos de RT-PCRq en tiempo real, se utilizó 1  $\mu$ g de ARN tratado con el enzima ADNasa I del kit DNAase I DNA-free kit (Ambion).

## Hibridación y escaneo de micromatrices

### Incorporación del aa-dUTP y reacción de RT

El ARN, tanto de muestras como de la referencia, se llevó a 30  $\mu\text{g}/15.5 \mu\text{l}$  dentro de tubos de 500  $\mu\text{l}$ . A este ARN se le añadió 3  $\mu\text{l}$  de oligo dTV 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y se mezcló bien para incubar a 70°C durante 10 minutos. A continuación los tubos se dejaron 3 minutos a temperatura ambiente y se incubaron posteriormente en hielo. Para la reacción de RT, a cada tubo se le añadió 12.6  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción (1X First strand buffer, 26 mM DTT, 0.5 mM dATP, 0.5 mM dCTP, 0.5 mM dGTP, 0.16 mM dTTP, 0.32 mM aa-dUTP y 200 U de SuperScript III RT (Invitrogen)). La reacción se incubó durante 3 horas a 50 °C. Posteriormente se eliminó el ARN mediante una hidrólisis de 15 minutos a 65°C por adición de 20  $\mu\text{l}$  de NaOH 1 M/0.5 M EDTA. La reacción se neutralizó con 10  $\mu\text{l}$  de HCl 1 M.

### 1° Purificación (eliminación de aminas libres y del aa-dUTP no incorporado) y marcaje del aa-ADNc

Con el fin de purificar el ADNc marcado de simple cadena se utilizó el Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen) con algunas modificaciones en el tipo de tampones de elución y de lavado.

A cada tubo se le añadió 300  $\mu\text{l}$  de tampón PB y después de mezclar se transfirió el contenido a una columna QiAquick que se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto. A partir de este momento se lavó dos veces la columna añadiendo 750  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato de lavado (5 mM KPO<sub>4</sub> pH8.0, 80% etanol). Finalmente se realizó la elución del contenido de la columna añadiendo dos volúmenes de 30  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato de elución (4 mM KPO<sub>4</sub> pH8.5). La muestra se secó con una centrifuga de vacío "speed-vac" durante 40 minutos a 40 °C.

El precipitado resultante se resuspendió en 9  $\mu\text{l}$  de 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.0 y la mezcla se transfirió a los tubos que contenían NHS-Cy3 éster y NHS-Cy5 éster secos (Amersham Pharmacia). La reacción de acoplamiento de los fluoróforos de cianina Cy3 (para los tubos de muestras) y Cy5 (para los de referencia), se llevó a cabo durante 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente.

### 2° Purificación (eliminación del fluoróforo no incorporado) y comprobación del marcaje

Esta nueva purificación del ADNc se realizó con el PCR Purification Kit (Qiagen). A cada tubo se le añadió 35  $\mu\text{l}$  de 100 mM NaOH pH 5.2 y a continuación se mezcló con 250  $\mu\text{l}$  de tampón PB. El contenido del tubo se traspasó a una columna QIAquick y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm. Los lavados de la columna se realizaron con cantidades decrecientes de tampón PE de 700  $\mu\text{l}$ , 400  $\mu\text{l}$  y 300  $\mu\text{l}$ , centrifugando en cada paso durante 1 minuto a 13000 rpm. La elución se hizo mediante la adición de dos volúmenes de 30  $\mu\text{l}$  de tampón EB (10 mM Tris-HCl) diluido 5 veces. Finalmente la muestra se precipitó y se secó utilizando una speed-vac durante 35-40 minutos a 40 °C. El pellet de ADNc marcado se resuspendió en 10  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O.

La eficacia del marcaje del ADNc se evaluó de dos maneras distintas:

**A) gel QC:**

Se preparó un gel 1xTAE/1% de agarosa en una cubeta Miniprotean (BioRad) y se utilizó para analizar electroforéticamente 1  $\mu$ l de ADNc marcado con 5  $\mu$ l de glicerol 15% a 100 V. Las carreras se cortaron y se dejaron secar sobre portaobjetos situados encima de bloques térmicos. Los ADNc separados de esta forma, se escanearon utilizando el GenePix Scanner 4000B y se obtuvo la imagen mediante el programa informático GenePix Pro 4.1. (Axon Instruments, CA, USA)

**B) Cuantificación por Nanodrop:**

La concentración de ADNc en ng/ $\mu$ l y la cantidad en picomoles de ADNc marcado se determinó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Thermo Fisher Scientific Inc., USA) con 1  $\mu$ l de muestra y agua como blanco.

Estabilización de la micromatriz e inmovilización

Se utilizaron micromatrices de ADNc (TOM1) que contenían 13440 “spots” correspondientes 8400 loci independientes de tomate (Figura 1.8).

Las micromatrices de ADNc se hidrataron mediante varias pasadas por una columna de vapor de agua durante unos pocos segundos, secándolas sobre la superficie caliente de un bloque térmico y enfriándolas sobre una superficie metálica. El ADNc se fijó a la superficie del cristal de la micromatriz por entrecruzamiento con luz UV a 150 mJ/cm<sup>2</sup>, utilizando un Crosslinker (Stratalinker).

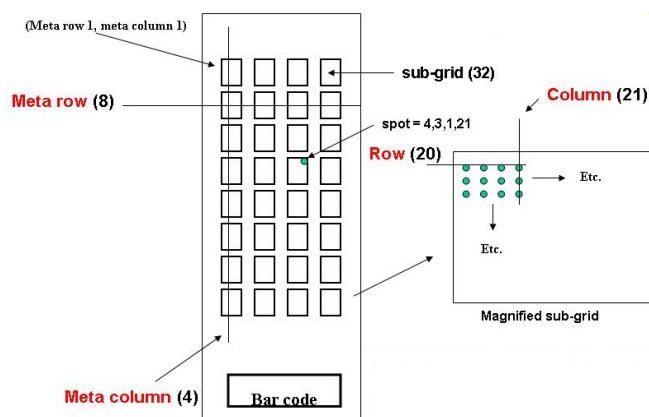


Figura 1.8. Esquema de la micromatriz de ADNc TOM1 de 13440 “spots” distribuidos en 32 sub-gradillas de 20 por 21, correspondientes a 8400 genes de tomate.

Pre-hibridación

Las micromatrices se incubaron durante 40 minutos en el interior de tubos de 50 ml que contenían 3X SSC/0.1% SDS/0.1 mg/ml de BSA en un baño de agua a 50 °C. A continuación se realizó un lavado de las micromatrices en agua mili Q durante 15 segundos, seguidos por 2

segundos de lavado en isopropanol, a continuación las micromatrices se secaron mediante una centrifuga basculante Sigma 302 (Sigma) a 10000 rpm durante 6 minutos.

#### Hibridación

Las micromatrices ya secas se situaron en el interior de una cámara de hibridación humidificada previamente con 36  $\mu$ l de agua; sobre el cristal de las micromatrices se colocaron los cubreobjetos LifterSlip (Eire Scientific, Portsmouth, USA). Los ADNcs marcados correspondientes a la muestra y a la referencia se mezclaron en un mismo tubo de 500  $\mu$ l y se desnaturalizaron a 95 °C durante 1 minuto. A continuación se añadió a cada tubo 40  $\mu$ l de solución de hibridación (3X SSC/0.1% SDS/0.1 mg/ml ADN de esperma de salmón), se homogeneizó la mezcla y se infiltró por capilaridad entre la micromatriz y el cubreobjetos. Finalmente se cerró la cámara de hibridación y se sumergió en un baño de agua a 50 °C durante 16 h.

#### Lavado de las micromatrices, escaneo y obtención de las imágenes

Para desprender los cubreobjetos después de la hibridación, las micromatrices se sumergieron en 2X SSC/0.1% SDS a 42 °C durante 5 minutos. A continuación se realizaron lavados con 0.1X SSC/0.1% SDS durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguidos por una serie de cuatro lavados con 0.1X SSC de 1 minuto cada uno a temperatura ambiente, seguida de un lavado de 30 segundos con 0.01X SSC. Finalmente las micromatrices se secaron mediante centrifugación durante 5 minutos.

Las imágenes NHS-Cy5/NHS-Cy3 se adquirieron por escaneo de las micromatrices utilizando un Genepix Scanner 4000B (Axon Instruments, Inc., USA) y se visualizaron mediante el paquete informático Genepix Pro 4.1. Primero se realizó un pre-escaneo de una resolución de 100  $\mu$ m/píxel ajustando el nivel de intensidad del fotomultiplicador de forma manual con la finalidad de conseguir una relación (ratio) de señal de los dos fluoróforos cercana a 1 y un número mínimo aproximado de 5 "spots" saturados de forma que las imágenes tengan un amplio rango de intensidades que sigan una distribución normal. Una vez ajustados los fotomultiplicadores se realizó un escaneo más fino con una resolución de 10  $\mu$ m/píxel.

#### Análisis de las imágenes y de los datos

Después del escaneo, las imágenes resultantes fueron capturadas y analizadas utilizando el programa informático Genepix Pro v. 4.1 (Axon Instruments, Inc., USA), considerándose como buenos "spots" aquellos con una intensidad local dos veces más alta que la intensidad debida al ruido de fondo del cristal, y marcándose el resto de "spots" que no cumplieran este requisito como no validos. Utilizando el programa Acuity v. 4.0 (Axon Instruments, Inc., USA); se realizó una normalización LOWESS entre los canales Cy3 y Cy5 y se creó un conjunto de datos con los "spots" válidos. Este conjunto de datos consistió en valores transformados de intensidad log M por triplicado para cada "spot". Se realizó un análisis ANOVA de una vía para grupos múltiples, con la finalidad de escoger solamente aquellos genes que cambiaban significativamente (p-valor < 0.05), considerando las tres réplicas por grupo. Para descartar la mayor parte de genes cuya expresión se consideró constitutiva, se seleccionaron aquellos "spots" que tuvieran un valor

absoluto  $\log M$  mayor o igual que 1 en al menos una de las tres micromatrices del grupo, y la intensidad de estos "spots" se normalizó a la intensidad de la muestra considerada como E0 (ovario en anthesis, sin tratamiento). Finalmente se realizó la media aritmética de las réplicas y los agrupamientos ("clusters") se llevaron a cabo utilizando los parámetros por defecto del programa Acuity: Para ellos se consideró una similaridad métrica basada en valores Pearson y cuadrados Euclídeos para los clusters jerárquicos y mapas auto-organizativos, y una varianza del 100% en el análisis de componentes principales (P.C.A.).

### **RT-PCRq en tiempo real**

Se obtuvo la primera cadena de ADNc a partir de 1  $\mu\text{g}$  de ARN libre de ADNasas, utilizando el kit FirstStrand Synthesis System (Invitrogen) para RT-PCR y siguiendo el protocolo del fabricante. Este ADNc se diluyó 1/3 en un volumen total de 100  $\mu\text{l}$ . Se utilizó un aparato ABI 7000 y el SyBrGreen Kit (Applied Biosystems) para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos así como para llevar a cabo el ensayo. Las concentraciones óptimas de los oligonucleótidos se determinaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se basan en la elección del valor más bajo de Ct y valor máximo de  $\Delta R_n$  para los triplicados de cada una de nueve combinaciones de concentraciones distintas.

Se utilizó como control interno un gen que codifica una proteína relacionada con la degradación por ubiquitinas (SGN-150644) en ensayos por triplicado con oligonucleótidos específicos (AAGCAATGGATGCTGAGGCT; GAAGGTGCCGTTGAATGACA) (Isogen).

La cuantificación relativa se realizó usando las curvas de amplificación para determinar el valor Ct medio que se normalizó al valor Ct medio correspondiente a la muestra E0 (en el caso del estudio del desarrollo partenocárpico temprano del fruto).

### 1.3. Resultados

#### Efecto del tratamiento hormonal sobre los ovarios emasculados

Se etiquetaron flores de tomate en el estadio de antesis a las que se dejó autopolinizar para recoger los frutos resultantes a los 2, 5 y 12 días post-antesis (dpa) y dar lugar a las muestras P2, P5 y P12. En paralelo, algunas flores fueron emasculadas un día antes de antesis para evitar la fertilización. Un grupo de ellas no fue sometido a ningún tratamiento adicional, y los carpelos no fertilizados se recogieron en el día de la antesis (muestra E0), y los días 2, 5 y 12 dpa, dando lugar a las muestras E2, E5 y E12. El resto de ovarios emasculados fueron tratados el día de la antesis con una única aplicación de 20 µl 0.3 mM GA3 o 0.1 mM 2.4-D y recolectados a los 2, 5 y 12 dpa (muestras G2, G5, G12 o D2, D5 y D12 respectivamente). Se permitió el desarrollo de un determinado número de ovarios/frutos de cada categoría hasta alcanzar la madurez en planta con objeto de seguir su desarrollo completo y la forma final del fruto. Los frutos desarrollados como consecuencia del tratamiento con 2.4-D mostraron carpelos más marcados así como una forma más alargada (puntiaguda en el extremo estilar) hasta alcanzar un tamaño final más grande incluso que el de los frutos fertilizados, mientras que los frutos tratados con GA3, fueron significativamente menores en cuanto al tamaño (Figura 1.9). La morfología final alargada en el extremo estilar es característica de los frutos inducidos con 2.4-D y coincide con la observada en frutos con mayor disponibilidad de hormona auxínica (de Jong et al., 2009; Goetz et al., 2007).

Se observó un crecimiento más rápido en los ovarios tratados con auxinas a tiempos tan tempranos como a los 2 dpa (ver Anexo I. Figura FS1). Imágenes proporcionadas por el Servicio de Microscopía Electrónica (S.E.M), muestran que los cortes de fruto a los 2 dpa experimentan un sobre-crecimiento del tejido correspondiente a la placenta en los frutos D2 cuando se comparan con las muestras G2 y P2. Este efecto resulta aún más evidente en las muestras D5, en las que la placenta ocupa casi la totalidad de la cavidad locular, oprimiendo los óvulos no fertilizados contra la pared interna del pericarpo.

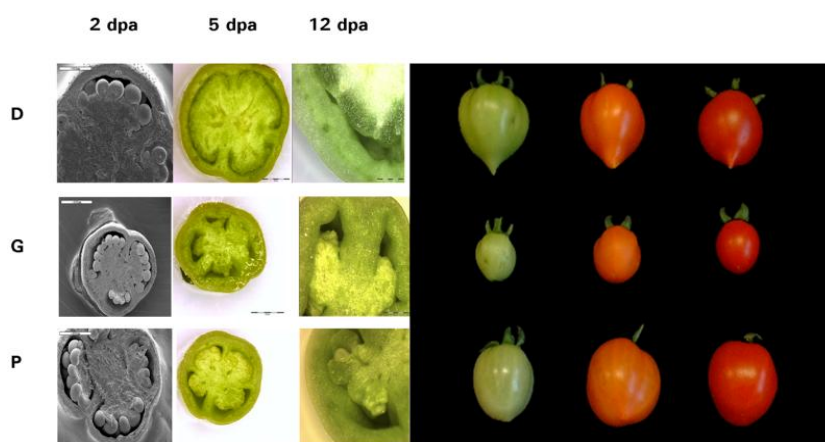


Figura 1.9. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido y de cortes observados en lupa de ovarios recogidos a 2, 5 y 12 dpas y fotografía mostrando tanto el tamaño final como la morfología de los frutos D (tratamiento con auxinas), G (tratamiento con GA3) y P (frutos fertilizados).



## Análisis de Micromatrices

El perfil transcripcional del desarrollo temprano del fruto de las diferentes muestras descritas anteriormente, se realizó utilizando la plataforma TOM1, una micromatriz de 13400 "spots" que representa 8400 unigenes de tomate (Alba et al., 2004). Con el propósito de realizar comparaciones sencillas y consistentes entre cada tipo de muestras a lo largo del tiempo de estudio, se optó por un diseño basado en la mezcla equimolar de ARNs procedentes de diversas muestras llamado diseño de referencia (Figura 1.10). Aunque una estrategia basada en un "loop" secuencial sería más adecuada para detectar diferencias sutiles entre un tiempo de estudio y el siguiente (Alba et al., 2004), el objetivo era encontrar también diferencias entre los distintos tratamientos y para ello el diseño de referencia común es el más adecuado. Además, el diseño basado en una referencia (mezcla de ARNs de cada una de las muestras) es el más comúnmente utilizado debido a que la variación "spot-a-spot" puede ser eliminada mediante el uso de *ratios* o *log-ratios*, a que permite realizar el experimento con menos cantidad de ARN y a que reduce el número de micromatrices a utilizar (Dobbin et al., 2003; Yang and Speed, 2002). En este caso la muestra de referencia consistió en una mezcla o "pool" de cantidades equivalentes de ARN procedente de las 13 muestras individuales a estudiar y el ensayo se realizó por triplicado utilizando tres muestras biológicas independientes obtenidas formando tres "pooles", dando lugar a un total de 39 micromatrices hibridadas (13 condiciones x 3 réplicas).

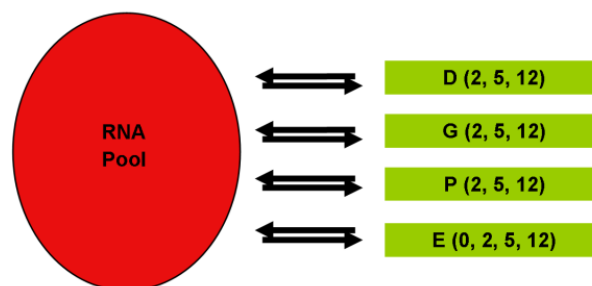


Figura 1.10. Diseño experimental consistente en comparar la población de ARN de cada muestra con una referencia formada por una mezcla de los ARNs (Pool). El ADNc procedente de la referencia se marcó con Cy5 (rojo) mientras que las muestras fueron marcadas con Cy3 (verde). En este caso la referencia consistió en la mezcla de las trece muestras a comparar: E0, E, G, P y D recogidos a los 2, 5, 12 dpa.

Después del escaneo, los "spots" se clasificaron de forma que aquellos con una intensidad neta dos veces más alta que la correspondiente al ruido de fondo fueron seleccionadas como "spots" de buena calidad (94.8% del total). En este estudio se consideraron solamente este tipo de "spots" en todas las micromatrices analizadas. Una vez obtenidos los conjuntos de datos correspondientes, en algunas hibridaciones se observó una distribución de intensidades verde/rojo resultado del sesgo en la diferencia de intensidades debidas a los propios fluoróforos. Para compensar esta diferencia, se decidió aplicar una transformación no lineal de los datos llamada normalización LOWESS. La normalización LOWESS es uno de los métodos más utilizados ya que resulta particularmente útil para minimizar la variación sistemática que se origina debido al sesgo

en la incorporación de los fluoróforos, así como a las diferencias en la excitación/emisión características de diferentes fluoróforos (Yang and Speed, 2002).

Se realizó un test estadístico One-Way ANOVA para grupos múltiples considerando las tres réplicas por grupo (tratamiento). Se identificaron un total de 2200 “spots” (16.5%) que mostraban cambios significativos ( $P < 0.05$ ). Se consideró un umbral de  $|\log M| > 1$  en al menos una micromatriz de las tres de cada grupo (ver Materiales y Métodos), obteniendo un total de 824 “spots” que mostraban cambios significativos en la expresión génica en al menos una situación del estudio. Cuando se compararon dos tratamientos, se consideraron como genes inducidos aquellos con un valor relativo  $\log M > 0.5$  y como genes reprimidos aquellos con un valor relativo  $\log M < -0.5$ .

La distribución de los resultados para el número total de genes reveló diferencias significativas, tanto a nivel de inducción como de represión génica, entre las muestras tratadas/fertilizadas (D, G y P) y las muestras no tratadas (E), como era de esperar (Figura 1.11), observándose además diferencias entre las muestras tratadas con auxinas respecto a los otros tratamientos en la fase más temprana de desarrollo del fruto/ovario estudiada (2dpa).

Un análisis por clúster jerárquico Pearson-Centered del conjunto de datos de expresión diferencial, permitió observar dos grandes grupos. Los tratamientos hormonales se agrupaban entre ellos y junto con las muestras E2 (ovarios no tratados 2 dpa), y dentro del mismo se agrupaban según el tiempo de desarrollo, mientras que las muestras E5 y E12 aparecían en el otro gran grupo (Figura 1.12B). Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) que explicaba el 100% de la varianza con el propósito de obtener una información general del grado de similitud de los datos (Figura 1.12A). Las muestras se distribuyeron a lo largo de tres componentes. La Componente 1 explicaba el 43.76% de la varianza mientras que las componentes 2 y 3 explicaron el 28.74% y el 9.40% de la varianza respectivamente.

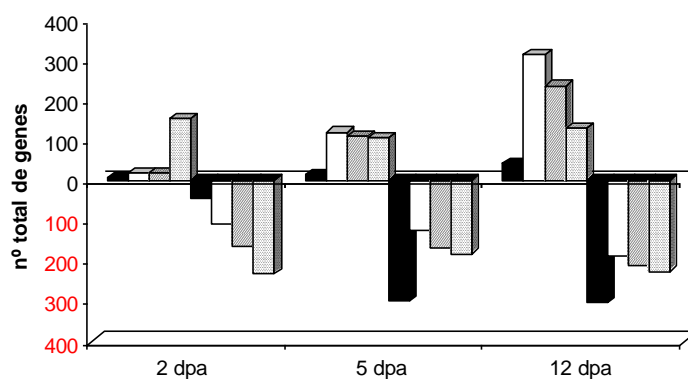


Figura 1.11. Número total de genes inducidos y número total de genes reprimidos (valores en rojo) a los 2, 5 y 12 dpa, relativo a los niveles de expresión en el ovario E0. Columnas: Negras: Ovarios E. Vacías: Ovarios P. Rayadas o Gris oscuro: Ovarios G. Punteadas o Gris claro: Ovarios D.

La representación PCA mostró que las muestras tratadas (tanto fertilizadas como tratadas con hormonas) se agrupaban siguiendo una especie de “curva de desarrollo” (Figura 1.12A), mientras

que la curva que siguen las muestras E0-E12 recorre una parte del espacio del PCA distinto indicando que en ellas ocurren procesos muy diferentes a nivel transcripcional. De forma global, se puede apreciar que, a pesar de las similitudes entre muestras tratadas y muestras fertilizadas a lo largo del periodo de estudio, las muestras tratadas con auxinas D2 continúan mostrando mayores diferencias respecto a los otros tratamientos en ovarios del mismo estadio, como ya se había observado (Figura 1.11).

### Mapman: expresión génica en forma de rutas metabólicas

Mapman consiste en una herramienta informática que representa "sets" de datos en forma de diagramas de rutas metabólicas (Thimm et al., 2004). Con objeto de tener una visión integral de qué rutas metabólicas estaban siendo diferencialmente afectadas por los tratamientos de inducción a fruto en las diferentes condiciones, nuestros datos de expresión significativos se normalizaron frente a los obtenidos en E0, y fueron analizados mediante este programa. (Figura 1.13).

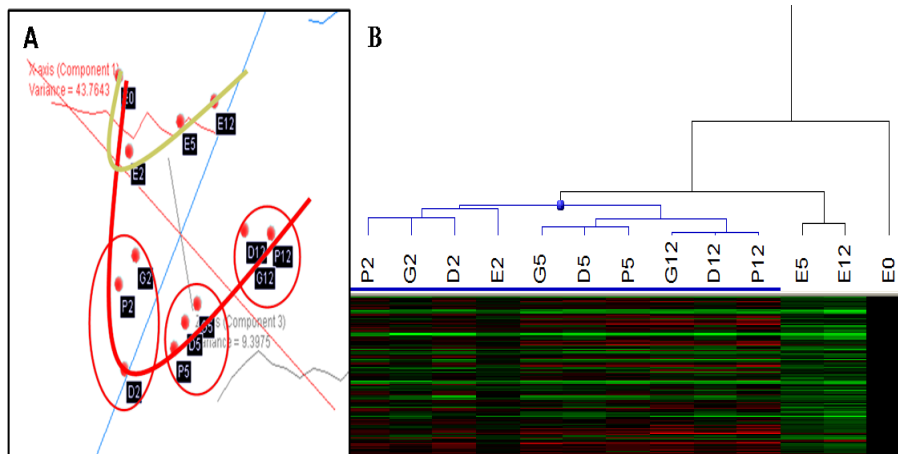


Figura 1.12. Análisis global del transcriptoma durante los primeros estadios de desarrollo del fruto según el tratamiento inductor. A) Análisis de Componentes Principales (P.C.A.) mostrando el agrupamiento por tiempos de recogida de las muestras tratadas. Esto se observa también en B) que consiste en un clúster jerárquico de todas las muestras con los valores normalizados a los de la muestra E0.

Una aplicación de Mapman, es la de detectar tendencias metabólicas mediante bloques de genes con una anotación obtenida previamente (Thimm et al., 2004) y asignarlos a una serie de categorías funcionales jerarquizadas (BINs, subBINs, enzimas individuales, etc.). Esta herramienta permite al usuario determinar a través del test estadístico Wilcoxon Rank Sum Test aquellas categorías funcionales que muestran un comportamiento diferente o están muy representadas en términos de perfiles de expresión en relación al resto de BINs, lo que sugeriría una tendencia. Esta opción estadística ha sido utilizada con nuestros datos de micromatrices aplicando la corrección Benjamini Hochberg para tener una mayor fortaleza del test y se ha considerado un p-valor inferior a 0.05 como significativo.

El análisis de estos datos reveló que en una fase tan temprana como a los 2 dpa variaban significativamente transcritos relacionados con defensa (categoría estrés). En todos los

tratamientos la mayor parte de estos transcritos se encontraron reprimidos respecto a E0. Resultados de RT-PCR cuantitativa en tiempo real parecían descartar un posible efecto de daño debido a la emasculación sobre la expresión de estos genes (ver Anexo I. Figura FS3).

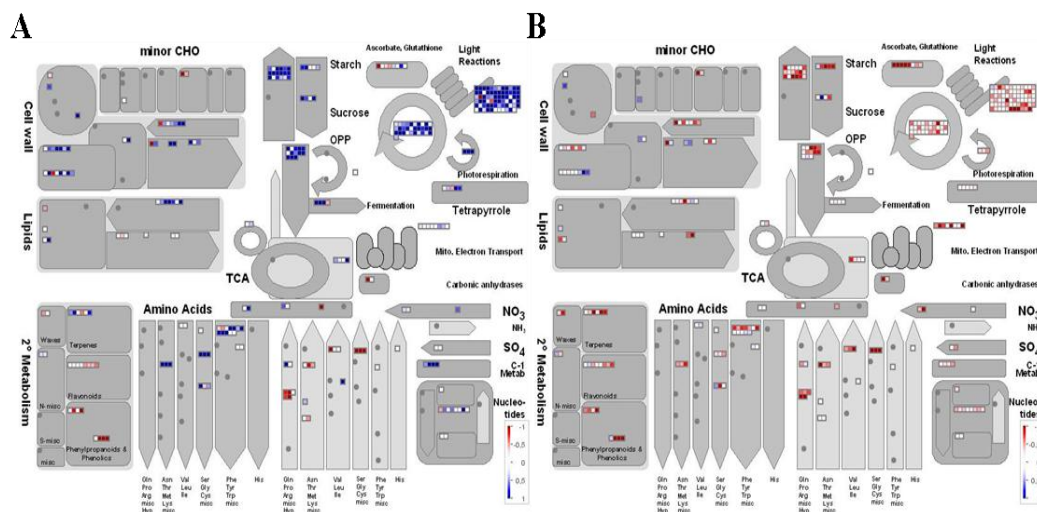


Figura 1.13. Ejemplo del programa Mapman, representando un esquema general del metabolismo. A) Comparación entre muestras P12 frente a ovarios E0. B) Comparación entre muestras E12 frente a ovarios E0. Azul: Inducción relativa a E0. Rojo: Represión relativa a E0.

En los ovarios de 2 dpa tratados con fitohormonas, aparecieron transcritos diferenciales relativos a la síntesis de ADN y remodelación de la cromatina (categoría ADN) que suponían el 20% de los transcritos que parecían seguir significativamente alguna tendencia. En los estadios de 5 y 12 dpa ya se observa la expresión diferencial significativa de genes relacionados con otras categorías; fotosistema (PS), factores de transcripción (RNA), metabolismo de carbohidratos y pared celular (Figura 1.14).

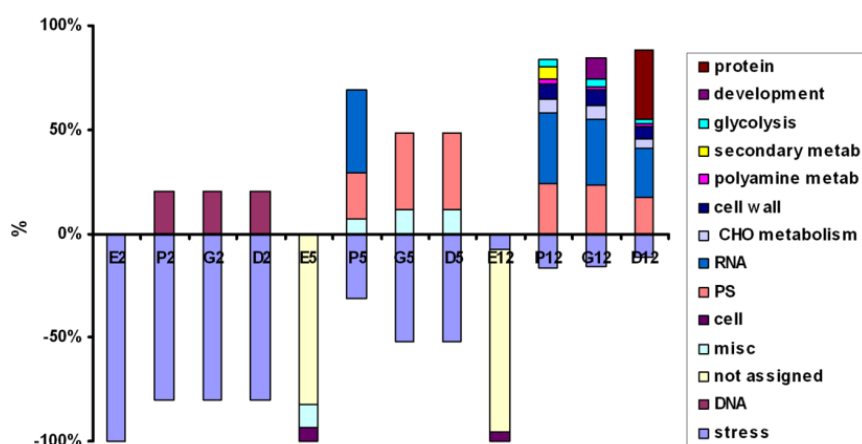


Figura 1.14. Representación del porcentaje de categorías funcionales con tendencia significativa (P-valor < 0.05) de sobre-expresión (valores positivos) o represión (valores negativos) respecto a la muestra E0 (ovarios emasculados y recogidos el día de la antesis). E: ovarios emasculados antes de la antesis sin tratar. P: ovarios polinizados con GA3. D: ovarios tratados con auxina (2.4-D).

Especificidad del tratamiento hormonal

El diseño de referencia utilizando como denominador común una mezcla de ARN de las muestras permitió realizar comparaciones directas considerando las tres réplicas de cada una de las muestras, con el fin de encontrar efectos específicos de hormona a nivel transcriptómico. Los diagramas de Venn (Figura 1.15) mostraron un programa de expresión génica común (8, 33 y 10), uno específico de auxinas (134, 38 y 7), uno específico de GAs (6, 40 y 28), y uno específico de ovarios polinizados (10, 58 y 98). Las auxinas parecían tener un efecto temprano, observándose una mayor diferencia a nivel transcriptómico entre los tratamientos a los 2 dpa, destacando el rápido efecto del tratamiento hormonal en las muestras D2 en las que destaca la sobre-expresión temprana de genes que codifican proteínas ribosomales, histonas (H2A, H2B) y RuBisCo. La tabla TS1 (ver Anexo I) muestra las categorías representadas por este grupo de genes que constituyen un 70.53% de los genes inducidos a los 2 dpa, por un 20.87% en el caso de los genes reprimidos respecto E0.

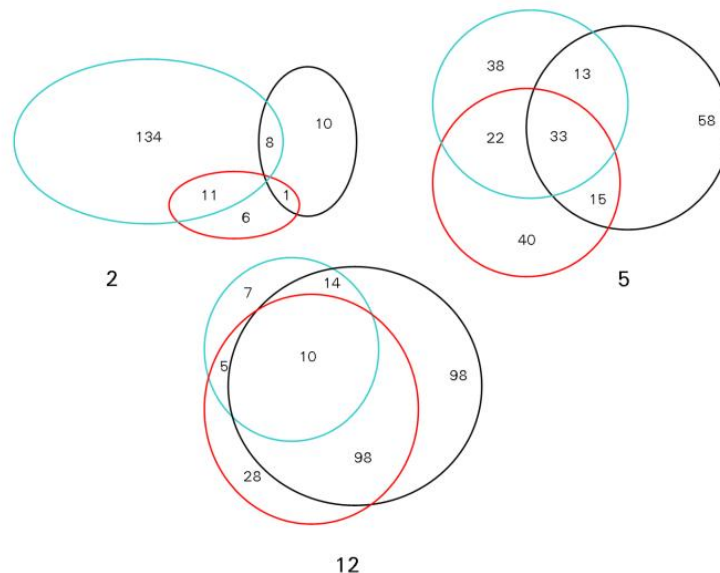


Figura 1.15. Diagramas de Venn representando el número de genes inducidos respecto al ovario en fase de antesis (E0). Se ha considerado como gen sobre-expresado aquel con un valor  $\log M > 0.5$  y como gen reprimido aquel con un valor  $\log M < -0.5$ . El porcentaje de genes sobre-expresados compartidos entre los tres tipos de muestras fue de 0%, 9.85% y 15.31% a los 2, 5 y 12 dpa respectivamente. Colores: Negro: muestras P (ovarios fertilizados). Rojo: muestras G (ovarios tratados con GA3). Azul: muestras D (ovarios tratados con auxina).

Los efectos debidos al tratamiento con giberelinas y a la fertilización resultaron más tardíos, aunque a 2 dpa destacó en las muestras G2 la sobre-expresión de dos genes que codifican una proteína de unión a ARN y una glucosil-transferasa y la expresión compartida con muestras D2 de un gen que codifica una proteína S-adenosil-metionina sintasa 3 (SAM3 sintasa). En muestras P2 se observó la sobre-expresión de un gen *jasmonic acid* (SGN-U216055) y un gen *fbp11* (SGN-U217280) relacionados con el desarrollo embrionario (ver Discusión). Aunque en general las diferencias entre tratamientos se suavizaron a lo largo del tiempo de estudio, los frutos G12 resultaron más semejantes a los P12 que a los D12.

Efecto de 2.4-D y GA<sub>3</sub> sobre la expresión de genes de biosíntesis y rutas de señalización hormonal de auxinas y giberelinas

Con el fin de determinar el efecto del tratamiento exógeno en las rutas de biosíntesis y señalización de auxinas y giberelinas del ovario, se representaron los niveles de expresión de los genes relacionados con estas hormonas y que mostraban una tendencia significativa (Figura 1.16). A los 2 dpa destaca la abundancia de transcritos correspondientes al gen que codifica la giberelina 20-oxidasa-3 en los ovarios tratados de manera exógena con 2.4-D. Por el contrario los niveles de transcrito correspondiente a la enzima de inactivación de GAs, la giberelina 2-oxidasa disminuyen tanto en frutos fertilizados y en ovarios emasculados tratados con auxinas, y se mantienen en niveles de expresión bajas a los 5 y 12 dpa.

El tratamiento con GA<sub>3</sub> produce a los 2 dpa un incremento en la abundancia de los transcritos de giberelina 2-oxidasa que disminuye a los 5 y 12 dpa. Los transcritos del gen *SIGA20ox-3* (SGN-U219631) se mantienen en niveles elevados en los ovarios a los 5 dpa tratados con 2.4-D y aumentan en ovarios fertilizados alcanzando niveles elevados a los 12 dpa (Figura 1.16B y 1.16C).

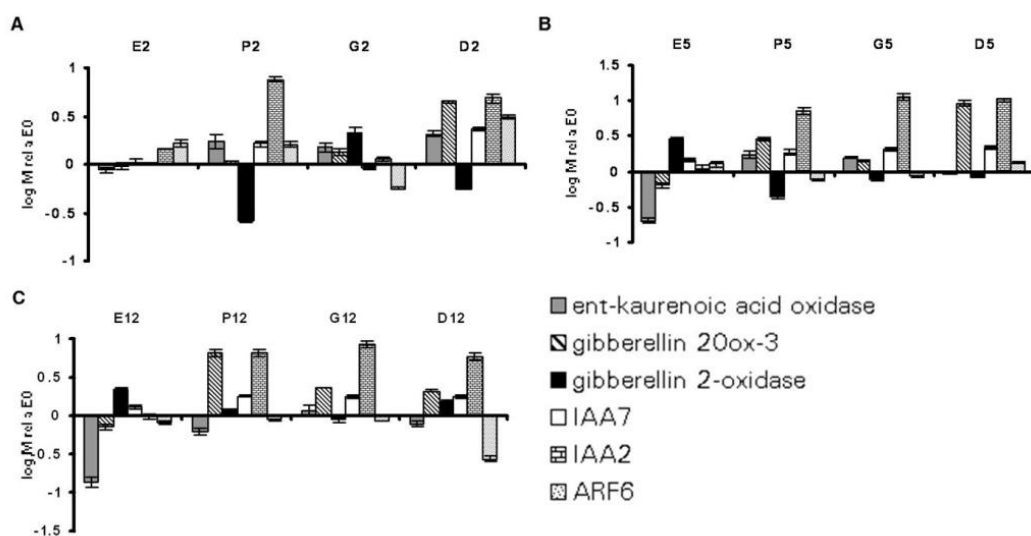


Figura 1.16. Niveles de expresión relativos a los del ovario emasculado en fase de antesis (E0) de los genes *ácido ent-kaurénico oxidasa* (SGN-U213253), *SIGA20ox3* (SGN-U219631), *SIGA2ox* (SGN-U216196), *IAA7* (SGN-U216526), *IAA2* (SGN-U218763), *ARF6* (SGN-U218169), a los 2 dpa (A), 5 dpa (B) y 12 dpa (C). E, ovarios emasculados sin tratar; P, ovarios fertilizados; G, ovarios emasculados tratados con GA<sub>3</sub>; D, ovarios emasculados tratados con 2.4-D. Las barras representan la media aritmética +/- SD de tres micromatrices correspondientes a tres réplicas biológicas.

En cuanto a los genes de regulación de la transducción de señal de auxinas, el 2.4-D incrementa la cantidad de transcritos de los represores IAA/Aux IAA7 (SGN-U216526) y IAA2 (SGN-U218763) en ovarios de 2 dpa de manera similar a lo que ocurre en ovarios polinizados. Este aumento ocurre también en ovarios emasculados de 5 dpa tratados con GA<sub>3</sub> mientras que en ovarios emasculados sin tratamiento los niveles de estos transcritos disminuyen a lo largo del proceso de desarrollo. Los niveles de ARNm de *ARF6* (SGN-U218169) también se incrementan

tempranamente en muestras tratadas con 2.4-D, pero disminuyen a los 5 y 12 dpa hasta alcanzar niveles incluso más bajos que en ovarios tratados con GA<sub>3</sub> y ovarios fertilizados.

### Análisis transcriptómico de plantas transgénicas antisentido del gen *SIDELLA*

Con el fin de profundizar en los cambios del transcriptoma que ocurren durante el desarrollo del fruto, analizamos el caso de frutos partenocárpicos obtenidos mediante alteración de la respuesta a GAs en plantas de tomate portadoras de la construcción <sup>as</sup>SIDELLA (Marti et al., 2007). Esto nos permitió contrastar los resultados de los frutos partenocárpicos obtenidos mediante el tratamiento exógeno del ovario con fitohormonas GAs con los obtenidos en frutos de las plantas <sup>as</sup>SIDELLA. Se realizaron tres ensayos de micromatrices en las que se enfrentaron de forma directa ADNc procedente de ovarios fertilizados de 5 dpa (P5) de plantas control no transformadas silvestres Wt o "wild type", con ADNc procedente de ovarios 5 dpa partenocárpicos de plantas de la línea 5A transgénicas antisentido del gen *SIDELLA* (<sup>as</sup>SIDELLA 5A).



Estas plantas transgénicas presentan varias alteraciones (Figura 1.17), como por ejemplo un fenotipo más estirado que las Wt. Desde el punto de vista del desarrollo del fruto, lo más interesante de este tipo de transformantes es la capacidad de producir frutos partenocárpicos bajo condiciones normales de crecimiento (Marti et al., 2007).

Figura 1.17. Planta silvestre (Wt) y planta transgénica DELLA antisentido (<sup>as</sup>SIDELLA) en el mismo estadio de desarrollo. Adaptado de Martí et al., 2007.

La comparación directa entre ovarios tratados de manera exógena G5 frente a ovarios P5 no produjo ninguna categoría funcional significativa concreta. Sin embargo, en las comparaciones de <sup>as</sup>SIDELLA frente a ovarios P5 silvestres, aparecieron inducidos algunos transcritos relacionados con mecanismos de defensa, principalmente con proteínas relacionadas con respuesta a daño y a respuesta frente a patógenos (Sn-1, quitinasas, PR6, PRP2, P4) (ver Anexo I. Tabla TS3).



Figura 1.18. Diagrama de Venn mostrando la distribución de 1867 genes con expresión más consistente (desviación típica < 0.05) y los que presentan una expresión significativa (p-valor < 0.05) considerando las tres réplicas de micromatrices correspondientes a ovarios de 5 dpa inducidos con GA<sub>3</sub> (G5) y ovarios <sup>as</sup>SIDELLA 5 dpa. Se ha considerado como sobre-expresión valores absolutos log M > 0.5 en los dos tipos de muestras.

Un resultado similar se obtuvo al comparar tejido procedente de partes no reproductivas de los dos tipos de plantas, observándose de nuevo niveles más elevados de transcritos relacionados con defensa a estrés biótico en las plantas transgénicas, siendo esta categoría la única con una tendencia significativa ( $p$ -valor  $<0.05$ ). La Tabla 1.1 muestra los transcritos sobre-expresados ( $\log M > 0.5$ ) correspondientes a las tablas TS3 y TS4 (ver Anexo I) coincidentes entre entrenado y ovario de 5 dpa de plantas <sup>as</sup>SIDELLA. Como puede observarse la mayor parte de transcritos corresponden a proteínas de respuesta frente a algún tipo de estrés biótico/abiótico.

Tabla 1.1. Genes sobre-expresados ( $\log M > 0.5$ ) de manera significativa ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) respecto a la planta silvestre coincidentes entre entrenado (EN9) y ovario de 5 dpa de plantas <sup>as</sup>SIDELLA.

SGN-U	TGAS/Wt EN9	TGAS/Wt 5dpa	Best BLAST Hit
145000	1.675	1.26	wound-induced protein (clone TAB7)
145000	1.9	1.17	wound-induced protein (clone TAB7)
143838	2.002	0.978	pathogenesis-related protein PR-1
No sequence	1.104	0.956	
145000	1.907	0.92	wound-induced protein (clone TAB7)
No sequence	1.98	0.914	
144109	2.193	0.792	lipid transfer protein LTP1 precursor
144946	0.861	0.772	TMV response-related gene product
143880	1.604	0.725	CER1 protein [Arabidopsis thaliana]
143242	2.154	0.624	Pathogenesis-related leaf protein 6
143518	1.356	0.617	TSI-1 protein - tomato
143242	2.196	0.605	Pathogenesis-related leaf protein 6
143338	0.591	0.548	Basic 30 kDa endochitinase precursor
146189	0.818	0.536	expressed protein [Arabidopsis thaliana]
143242	2.274	0.522	Pathogenesis-related leaf protein 6

Las comparaciones directas entre ADNc de ovarios 5 dpa <sup>as</sup>SIDELLA frente ovarios G5, dieron como resultado 80 genes diferenciales ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) con al menos el doble de nivel de expresión en los ovarios <sup>as</sup>SIDELLA respecto a los tratados con GA<sub>3</sub> (Figura 1.18). El análisis de términos ontológicos (“GO terms”) de este grupo de genes reveló algunas categorías sobrerrepresentadas ( $P$ -valor corregido-Bonferroni inferior a 0.05) a destacar las de catabolismo de carbohidratos (poligalacturonasas, endoquitinasas), biosíntesis de etileno (ACC sintasas y ACC oxidasas) y procesos catabólicos de la pared celular y respuesta a estrés biótico (endoquitinasas, proteínas PR). Con la finalidad de confirmar la expresión de estos genes de respuesta a estrés en ovarios <sup>as</sup>SIDELLA, se realizaron análisis mediante RT-PCR cuantitativa de los niveles de expresión del gen *Sn-1* de respuesta a daño y del gen *PRP2* de respuesta a estrés biótico. El análisis mostró niveles de expresión del gen *Sn-1* similares tanto en ovarios inducidos con GA<sub>3</sub> como en ovarios de plantas <sup>as</sup>SIDELLA y ovarios fertilizados. Por otro lado, los niveles de expresión del gen *PRP2* se encontraron inducidos solamente en ovarios y entrenado de las plantas transgénicas (Figura 1.19). El análisis de términos ontológicos de 1600 genes con niveles de expresión similar entre ovarios <sup>as</sup>SIDELLA y ovarios G5 reveló que la categorías “fotosíntesis” (proteínas de unión a clorofila, RuBisCo, fosfoenolpiruvato carboxilasa) y la “ubiquitinación de histonas” (proteínas ubiquitinas) se encontraban sobrerrepresentadas en este grupo de genes. En cuanto a 187 transcritos más abundantes en ovarios G5 se encontraron como significativos genes que codifican la expresión de inhibidores de proteasas (Anexo I. Tabla TS2).



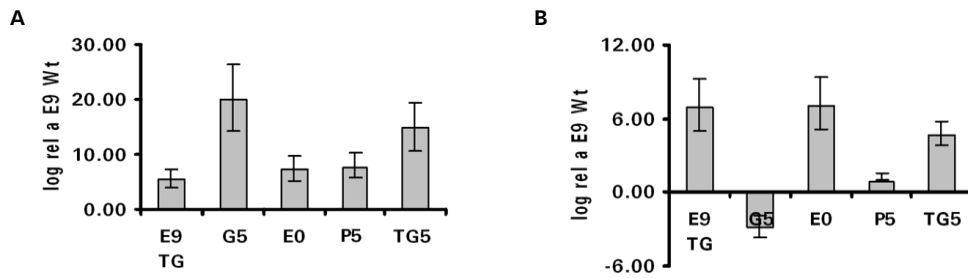


Figura 1.19. Representaciones de RT-PCRq en las que se observan niveles de expresión relativa a los niveles presentes en el entrenudo 9 en plantas silvestres. A) niveles del gen que codifica la proteína Sn-1 relacionada con estrés por daño. B) niveles de expresión del gen PRP2 de respuesta a patógenos. E9: Entrenudo 9. TG: Transgénicas <sup>as</sup>SIDELLA. TG5: Ovarios 5 dpa de plantas <sup>as</sup>SIDELLA. P5: Ovarios fertilizados 5 dpa de plantas silvestres. G5: Ovarios de 5 dpa silvestres emasculados e inducidos mediante GA<sub>3</sub>. E0: Ovarios emasculados de plantas silvestres recogidos en fase de antesis.

Efecto del silenciamiento de SIDELLA sobre la expresión de genes de biosíntesis y rutas de señalización hormonal de auxinas y giberelinas

Con la finalidad de determinar el efecto del silenciamiento del gen *SIDELLA* sobre los procesos de biosíntesis y señalización de GAs y auxinas, se representaron los niveles de expresión de los genes de la Figura 1.16 respecto a ovarios <sup>as</sup>SIDELLA (Figura 1.20). En los ovarios de 5 dpa de las plantas <sup>as</sup>SIDELLA los niveles de expresión de la enzima ácido ent-kaurenoico oxidasa son más altos que en ovarios silvestres fertilizados, y lo mismo se observó en el caso de la expresión de un gen que codifica una enzima GA 2-oxidasa. Por otro lado, los niveles de expresión de *SIGA20ox-3* disminuyen respecto a los niveles en ovarios fertilizados. La pérdida de función de *SIDELLA* no pareció afectar la expresión de los genes represores de la señalización por auxinas, puesto que los niveles de expresión relativos de algunos genes Aux/IAA como *IAA7* e *IAA2* y de un gen ARF como *ARF6* se mantuvieron en valores bajos de expresión respecto a los niveles en ovario polinizado (Figura 1.20A). Al comparar la expresión de estos mismos genes en ovarios de 5 dpa de plantas <sup>as</sup>SIDELLA respecto a los niveles en ovarios G5, se observaron escasas diferencias en los niveles expresión de estos genes, exceptuando el caso del gen que codifica la GA 2-oxidasa con niveles de transcritos visiblemente más elevados en ovarios tratados con GA<sub>3</sub> (Figura 1.20B).

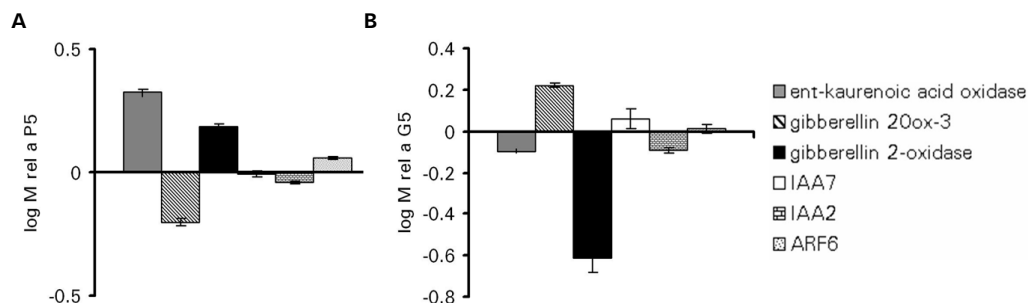


Figura 1.20. Niveles de expresión de los genes ácido ent-kaurenoico oxidasa (SGN-U213253), *SIGA20ox3* (SGN-U219631), *SIGA2ox* (SGN-U216196), *IAA7* (SGN-U216526), *IAA2* (SGN-U218763), *ARF6* (SGN-U218169) en ovarios de 5 dpa <sup>as</sup>SIDELLA relativos a los niveles en ovarios de plantas silvestres de 5 dpa (P5) (A), y relativos a los niveles en ovarios emasculados y tratados con GA<sub>3</sub> de 5 dpa (G5) (B). Las barras representan la media aritmética +/- SD de tres micromatrices correspondientes a tres réplicas biológicas.

## Análisis transcriptómico y metabolómico de pericarpio de frutos de tomate en proceso de maduración

Un estudio similar al realizado para las primeras fases de desarrollo se llevó a cabo en frutos en la fase de maduración. Se utilizaron frutos correspondientes a las mismas clases P, G y D que en el experimento anterior, obtenidos por estímulos puntuales alrededor de la antesis (fertilización o tratamiento según el caso) que ocurrieron entre 40-50 días antes del muestreo. Para este ensayo se utilizó el ARN extraído de pericarpio de frutos en fase IV temprana equivalente al estadio Verde Maduro (MG) y frutos en fase IV tardía equivalentes al estadio Rojo Maduro (R). De nuevo, se utilizó una estrategia basada en una referencia consistente en la mezcla de ARNs de todas las muestras ("pool"), realizándose tres réplicas biológicas.

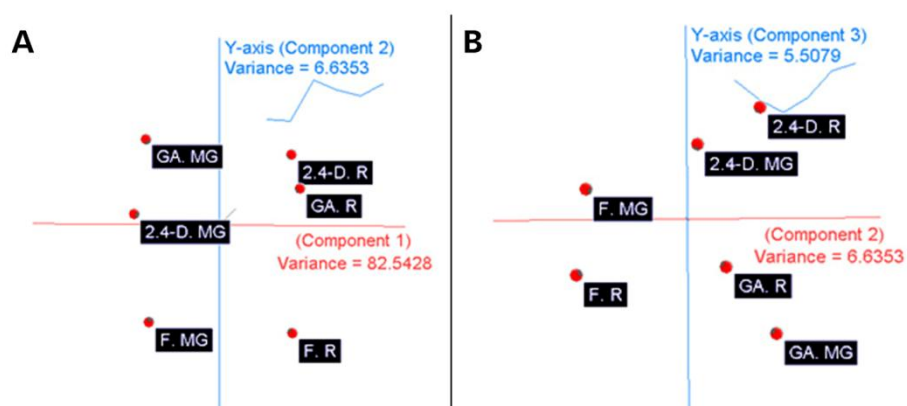


Figura 1.21. Representación del análisis PCA en la que las muestras aparecen agrupadas por estadio de maduración, según la primera componente en A). B) representación según la segunda componente. GA: Frutos inducidos por GA3, 2.4-D: Frutos inducidos por auxina, F: Frutos polinizados. MG: Frutos en fase Verde Maduro, R: Frutos en fase Rojo Maduro.

El análisis PCA reveló que el 82.5% de la variación explicada por la primera componente, se debía al estadio de maduración de las muestras (fruto verde o rojo), mientras que la segunda y tercera componente explicaban el 6.6% y el 5.5% de la variación respectivamente (Figura 1.21A). La tabla TS5 (ver Anexo I) muestra los genes con los valores más extremos de la primera componente que separaba las muestras según el estadio de maduración. Los valores más positivos corresponden a genes típicos relacionados con el proceso de maduración con un elevado número de ESTs presentes en genotecas de frutos en estadios "breaker" o Rojo Maduro, según la base de datos de expresión en tomate de la Universidad de Cornell ([ted.bti.cornell.edu/](http://ted.bti.cornell.edu/)). Como era de esperar, los valores de expresión de estos genes no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p$ -valor  $>0.05$ ) en un test ANOVA para grupos múltiples debido a que la primera componente no separa las muestras de acuerdo al tratamiento sino por estadio de maduración. La 2ª Componente (6.6% de la variación) separa las muestras inducidas mediante tratamiento hormonal (valores positivos de la 2ª Componente) de las muestras fertilizadas (valores negativos de la 2ª Componente) (Figura 1.21B). La tablas 1.2 y 1.3, muestran las categorías funcionales enriquecidas a las que pertenecen los genes que contribuyen a esta separación según la base de datos de expresión en tomate de la Universidad

de Cornell (<http://ted.bti.cornell.edu/>). Como puede observarse, en el pericarpo de los frutos fertilizados ocurren un mayor número de procesos con una tendencia significativa (como la modificación de pared celular, biosíntesis de carbohidratos, respuesta a estímulos hormonales y respuesta a estrés) que en pericarpo de frutos inducidos mediante auxina o GAs que comparten un número considerablemente menor de procesos significativos (transcripción, respuesta a etileno, quitinasas o catabolismo de N-acetilglucosamina).

**Tabla 1.2. Categorías funcionales enriquecidas de forma significativa (p-valor corregido Bonferroni <0.05) de genes con valores positivos de la Componente 2 de la Figura 1.21.**

<u>Gene Ontology term</u>	<u>Cluster frequency</u>	<u>Genome frequency of use</u>	<u>Raw P-value</u>	<u>Corrected P-value</u>
N-acetylglucosamine catabolic process	7 out of 394 genes, 1.8%	24 out of 13440 genes, 0.2%	3.96E-06	0.00178
transcription	41 out of 394 genes, 10.4%	734 out of 13440 genes, 5.5%	5.38E-05	0.02416
response to ethylene stimulus	16 out of 394 genes, 4.1%	181 out of 13440 genes, 1.3%	8.53E-05	0.03831

**Tabla 1.3. Categorías funcionales enriquecidas de forma significativa (p-valor corregido Bonferroni <0.05) de genes con valores negativos de la Componente 2 de la Figura 1.21.**

<u>Gene Ontology term</u>	<u>Cluster frequency</u>	<u>Genome frequency of use</u>	<u>Raw P-value</u>	<u>Corrected P-value</u>
cell wall organization	19 out of 407 genes, 4.7%	94 out of 13440 genes, 0.7%	4.09E-11	2.18E-08
glucosinolate biosynthetic process	11 out of 407 genes, 2.7%	35 out of 13440 genes, 0.3%	3.72E-09	1.98E-06
response to chitin	17 out of 407 genes, 4.2%	123 out of 13440 genes, 0.9%	1.70E-07	9.08E-05
ripening	15 out of 407 genes, 3.7%	103 out of 13440 genes, 0.8%	4.57E-07	0.00024
carbohydrate biosynthetic process	21 out of 407 genes, 5.2%	217 out of 13440 genes, 1.6%	2.73E-06	0.00145
putrescine biosynthetic process	4 out of 407 genes, 1.0%	6 out of 13440 genes, 0.0%	1.18E-05	0.0063
regulation of secondary metabolic process	8 out of 407 genes, 2.0%	40 out of 13440 genes, 0.3%	2.16E-05	0.01153
floral organ abscission	5 out of 407 genes, 1.2%	13 out of 13440 genes, 0.1%	2.61E-05	0.01391
carboxylic acid metabolic process	38 out of 407 genes, 9.3%	622 out of 13440 genes, 4.6%	3.04E-05	0.0162
response to hormone stimulus	40 out of 407 genes, 9.8%	669 out of 13440 genes, 5.0%	3.04E-05	0.01622
response to carbohydrate stimulus	18 out of 407 genes, 4.4%	197 out of 13440 genes, 1.5%	3.07E-05	0.01634
organic acid metabolic process	38 out of 407 genes, 9.3%	624 out of 13440 genes, 4.6%	3.26E-05	0.01738
response to brassinosteroid stimulus	10 out of 407 genes, 2.5%	69 out of 13440 genes, 0.5%	4.00E-05	0.02128
arginine catabolic process	4 out of 407 genes, 1.0%	8 out of 13440 genes, 0.1%	5.26E-05	0.02801

polyamine metabolic process	5 out of 407 genes, 1.2%	15 out of 13440 genes, 0.1%	5.80E-05	0.03088
response to jasmonic acid stimulus	15 out of 407 genes, 3.7%	154 out of 13440 genes, 1.1%	6.75E-05	0.03594
response to stress	75 out of 407 genes, 18.4%	1605 out of 13440 genes, 11.9%	7.46E-05	0.03972
abscission	5 out of 407 genes, 1.2%	16 out of 13440 genes, 0.1%	8.23E-05	0.0438
ethylene biosynthetic process	9 out of 407 genes, 2.2%	61 out of 13440 genes, 0.5%	8.42E-05	0.04481
alkene biosynthetic process	9 out of 407 genes, 2.2%	61 out of 13440 genes, 0.5%	8.42E-05	0.04481
cell wall modification during abscission	4 out of 407 genes, 1.0%	9 out of 13440 genes, 0.1%	9.25E-05	0.04922

Con la finalidad de determinar si las diferencias observadas a nivel transcriptómico (Figura 1.21B), morfológico (Figura 1.9), así como en el porcentaje de grados Brix (ver Anexo I. Figura FS2) tenían un reflejo a nivel metabólico, se analizó el complemento metabólico del pericarpio de frutos fertilizados y del pericarpio de frutos inducidos por tratamiento hormonal. Para ello se enviaron muestras de pericarpio de estos frutos al laboratorio del Dr. Alisdair Fernie en el Instituto MaxPlanck de Fisiología Vegetal (Potsdam, Alemania). Allí se realizó una cuantificación del contenido de metabolitos primarios y parte de los secundarios en estas muestras y se analizaron en relación con el contenido en el pericarpio de los frutos fertilizados (t–student; p-valor < 0.05). Dicho análisis se realizó tanto en el estadio Verde Maduro (MG) como en Rojo Maduro (R) (Tabla 1.4 y Tabla 1.5 respectivamente).

Tabla 1.4. Cantidades relativas (“Fold Change”) de metabolitos en pericarpio de frutos tratados de manera exógena con giberelinas (G) o auxinas (D), con respecto al pericarpio de tomates fertilizados en el estadio MG. En negrita se destacan los metabolitos que cambian de manera significativa respecto al pericarpio en fruto fertilizado.

<u>Metabolito</u>	<u>Fold Change (G)</u>	<u>P-valor</u>	<u>Fold Change (D)</u>	<u>P-valor</u>
glucose-6-P	231,43	<b>0,02</b>	1,10	0,53
inositol-1-P	59,97	<b>0,00</b>	1,00	0,55
fructose-6-P	59,78	<b>0,03</b>	1,22	0,48
glutamate	8,53	<b>0,02</b>	17,74	<b>0,00</b>
aspartate	5,29	<b>0,02</b>	7,08	<b>0,00</b>
saccharate	4,18	0,21	0,88	0,80
fumarate	3,63	<b>0,00</b>	2,06	<b>0,00</b>
mannose	3,35	<b>0,01</b>	2,10	0,13
asparagine	3,05	<b>0,01</b>	4,32	<b>0,00</b>
cysteine	3,00	<b>0,00</b>	4,04	<b>0,02</b>
inositol	2,87	0,06	1,40	0,32
proline	2,61	0,18	1,56	0,20
ornithine/arginine	2,48	<b>0,02</b>	5,19	<b>0,00</b>
maltose	2,31	<b>0,00</b>	0,92	0,81
mannitol	2,27	0,36	0,70	0,36
<b>a-Ketoglutarate</b>	2,15	0,13	11,89	<b>0,00</b>
dopamine	1,75	0,39	1,34	0,42
<b>putrescine</b>	1,73	<b>0,01</b>	1,90	0,06
<b>threonate</b>	1,64	<b>0,03</b>	1,28	0,13
<b>ribose</b>	1,64	<b>0,00</b>	1,63	<b>0,01</b>
<b>dehydroascorbate</b>	1,63	<b>0,01</b>	0,91	0,65
<b>succinate</b>	1,54	0,08	1,50	<b>0,02</b>
<b>uracil</b>	1,44	<b>0,01</b>	1,02	0,95
rhamnose	1,41	0,08	1,08	0,47
galactose	1,38	0,13	1,11	0,62

gluconate	1,35	0,67	0,88	0,78
<b>serine</b>	1,32	0,27	1,72	<b>0,01</b>
citramalate	1,32	0,24	1,49	0,06
<b>pyroglutamic</b>	1,31	0,06	1,86	<b>0,00</b>
<b>glycerate</b>	1,29	0,12	1,84	<b>0,00</b>
isocitrate	1,19	0,62	1,11	0,71
arabinose	1,14	0,63	0,85	0,50
galacturonate	1,14	0,87	1,66	0,19
<b>shikimate</b>	1,14	0,40	1,48	<b>0,02</b>
sucrose	1,12	0,80	0,96	0,82
valine	1,03	0,89	1,21	0,09
alanine	1,02	0,93	0,90	0,37
xylose	1,01	0,92	0,96	0,72
phosphate	1,00	0,99	0,96	0,58
glycolate	0,98	0,92	0,82	0,23
<b>aconitate</b>	0,92	0,77	0,46	<b>0,03</b>
<b>glycine</b>	0,92	0,59	1,58	<b>0,02</b>
benzoate	0,91	0,60	0,87	0,40
<b>glycerol</b>	0,89	0,44	0,66	<b>0,01</b>
<b>citrate</b>	0,87	0,05	0,81	<b>0,04</b>
malate	0,84	0,13	0,80	0,15
threonine	0,83	0,32	1,31	0,05
fructose	0,82	0,08	0,96	0,45
<b>glucose</b>	0,80	<b>0,04</b>	0,93	0,27
<b>hydroxylamine</b>	0,78	<b>0,01</b>	0,83	<b>0,03</b>
<b>quininate</b>	0,77	0,09	0,56	<b>0,00</b>
GABA	0,75	0,26	0,96	0,71
isoleucine	0,73	0,10	1,30	0,10
gentiobiose	0,43	0,05	0,89	0,74

Tabla 1.5. Cantidades relativas ("Fold Change") de metabolitos en pericarpio de frutos tratados de manera exógena con giberelinas (G) o auxinas (D), con respecto al pericarpio de tomates fertilizados en el estadio R. En negrita se destacan los metabolitos que cambian de manera significativa respecto al pericarpio en fruto fertilizado.

<u>Metabolito</u>	<u>Fold Change (G)</u>	<u>P-valor</u>	<u>Fold Change (D)</u>	<u>P-valor</u>
<b>fructose-6-P</b>	>300	<b>0.00</b>	>300	<b>0.00</b>
<b>glucose-6-P</b>	>300	<b>0.00</b>	>300	<b>0.00</b>
<b>ornithine/arginine</b>	64.70	<b>0.00</b>	96.57	<b>0.00</b>
<b>proline</b>	13.33	<b>0.00</b>	13.61	<b>0.01</b>
<b>asparagine</b>	3.73	<b>0.00</b>	4.45	<b>0.00</b>
<b>serine</b>	3.50	<b>0.00</b>	3.03	<b>0.00</b>
<b>inositol</b>	3.44	<b>0.00</b>	1.94	<b>0.00</b>
<b>cysteine</b>	3.34	<b>0.00</b>	3.38	<b>0.00</b>
shikimate	3.04	0.13	1.39	0.07
<b>sucrose</b>	3.00	<b>0.02</b>	2.03	0.26
<b>fumarate</b>	2.70	<b>0.00</b>	1.78	<b>0.00</b>
<b>glycerate</b>	2.64	<b>0.00</b>	1.61	<b>0.00</b>
<b>mannose</b>	2.56	<b>0.00</b>	1.78	0.09
<b>aspartate</b>	2.55	<b>0.00</b>	4.08	<b>0.00</b>
<b>isoleucine</b>	2.48	<b>0.00</b>	3.22	<b>0.00</b>
<b>maltose</b>	2.45	<b>0.00</b>	2.22	<b>0.01</b>
<b>valine</b>	2.40	<b>0.00</b>	2.44	<b>0.00</b>
<b>putrescine</b>	2.34	<b>0.03</b>	1.19	0.27
<b>homoserine</b>	2.22	<b>0.00</b>	3.71	<b>0.00</b>
<b>glycine</b>	2.20	<b>0.00</b>	2.09	<b>0.00</b>
glycerol	2.11	0.29	0.85	0.15
<b>quininate</b>	2.05	<b>0.01</b>	1.07	0.55
<b>uracil</b>	1.99	<b>0.01</b>	1.34	0.37
<b>dehydroascorbate</b>	1.83	<b>0.00</b>	1.07	0.42
<b>glutamate</b>	1.71	<b>0.01</b>	2.72	<b>0.00</b>
<b>rhamnose</b>	1.70	<b>0.00</b>	1.29	<b>0.02</b>
<b>threonine</b>	1.69	<b>0.00</b>	1.85	<b>0.00</b>
<b>threonate</b>	1.52	<b>0.00</b>	2.27	<b>0.00</b>
<b>ribose</b>	1.45	<b>0.00</b>	1.54	<b>0.00</b>
<b>a-Ketoglutarate</b>	1.40	0.15	1.60	<b>0.01</b>
aconitate	1.37	0.29	1.11	0.74
<b>glucose</b>	1.35	0.16	1.57	<b>0.04</b>
<b>pyroglutamic</b>	1.33	<b>0.00</b>	1.83	<b>0.00</b>
gentiobiose	1.30	0.58	2.16	0.11
<b>GABA</b>	1.29	<b>0.00</b>	1.45	<b>0.03</b>
succinate	1.23	0.23	1.10	0.49
<b>phosphate</b>	1.23	<b>0.01</b>	1.33	<b>0.00</b>

alanine	1.18	0.27	5.80	0.22
fructose	0.95	0.67	1.30	<b>0.01</b>
saccharate	0.86	0.76	0.23	0.07
citrate	0.85	0.29	0.93	0.40
<b>malate</b>	0.81	0.13	0.43	<b>0.00</b>
glycolate	0.80	0.22	0.84	0.32
hydroxylamine	0.77	0.08	0.83	0.12
benzoate	0.73	0.05	0.89	0.39
mannitol	0.70	0.58	0.31	0.21
<b>arabinose</b>	0.69	<b>0.01</b>	0.51	<b>0.00</b>
<b>citramalate</b>	0.66	<b>0.00</b>	1.15	0.30
<b>xylose</b>	0.61	<b>0.00</b>	0.92	0.22
trehalose	0.41	0.35	0.46	0.39
<b>isocitrate</b>	0.40	<b>0.02</b>	0.83	0.17
<b>galactose</b>	0.31	<b>0.00</b>	0.41	<b>0.00</b>
<b>gluconate</b>	0.27	<b>0.04</b>	0.52	0.16
dopamine	0.21	0.35	0.36	0.45
<b>galacturonate</b>	0.09	<b>0.00</b>	0.35	<b>0.02</b>

Con el objetivo de determinar correlaciones y tendencias entre metabolitos y transcritos, se realizaron análisis de componentes principales (PCA) para fruto en fase MG y fruto en fase R por separado, considerando los metabolitos y los transcritos con cambios significativos (t-test p-valor < 0.05) respecto a pericarpo de tomates fertilizados (Figura 1.22). En ambos casos las tres primeras componentes explicaban aproximadamente el 86% de la variabilidad: la primera componente explicaba el 50% de la variabilidad, la segunda un 28% y la tercera un 7%.

Estos resultados se analizaron utilizando el programa Mapman y la base de datos de Plant MetGen Map (<http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/MetGenMAP/home.cgi>) lo que permitió la identificación de rutas y términos ontológicos que variaban de manera significativa según los datos de expresión génica y los datos de carácter metabólico (Tablas TS10-TS13. Anexo I).

En el caso de pericarpo de frutos en fase MG, la componente principal (1ª Componente) separaba las muestras de frutos fertilizados y frutos inducidos con auxina, de las muestras inducidas mediante GA<sub>3</sub> (Figura 1.22A), observándose una mayor variación entre éstas y las muestras fertilizadas agrupadas en el otro extremo de la componente. Las tablas TS6-TS9 (ver Anexo I) muestran los transcritos y metabolitos con una mayor contribución a la variación observada según la primera componente de manera que en el caso de frutos en fase MG, el pericarpo de las muestras con valores positivos de la 1ª componente (D y P) presentarían los niveles más elevados de glucosa, treonina, glicina, junto con niveles elevados de transcritos relacionados con la síntesis de etileno, factores de respuesta a etileno, síntesis de aminoácidos y modificación de pared celular (Tablas TS10 y TS12. Anexo I). El pericarpo de frutos inducidos por GA<sub>3</sub> sería más abundante en glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato, inositol 1-fosfato coincidiendo con una mayor abundancia de transcritos relacionados con síntesis de etileno (ACC oxidasas), ciclo celular y respuesta a estrés biótico (Tablas TS6 y TS7. Anexo I).

En frutos rojos se separan las muestras inducidas mediante ambos tratamientos de las muestras fertilizadas, observándose una mayor variación entre éstas, y las muestras inducidas mediante 2.4-D (Figura 1.22B). En el caso de fruto en fase R, niveles más elevados de glucosa-6-fosfato, fructosa 6-fosfato y sacarosa en pericarpos de muestras D y G, coinciden con valores de expresión más elevados de genes que codifican transcritos relacionados con la modificación de

pared celular (poligalacturonasas), catabolismo de aminoácidos y de respuesta a patógenos (estrés biótico) (Tablas TS11 y TS13. Anexo I). En muestras P (con valores negativos de la 1ª Componente) resultan más abundantes el malato, fructosa y glucosa que coinciden con una mayor abundancia de transcritos relacionados con respuesta a estrés biótico/abiótico, fotosíntesis y de respuesta a etileno (Tablas TS8 y TS9).

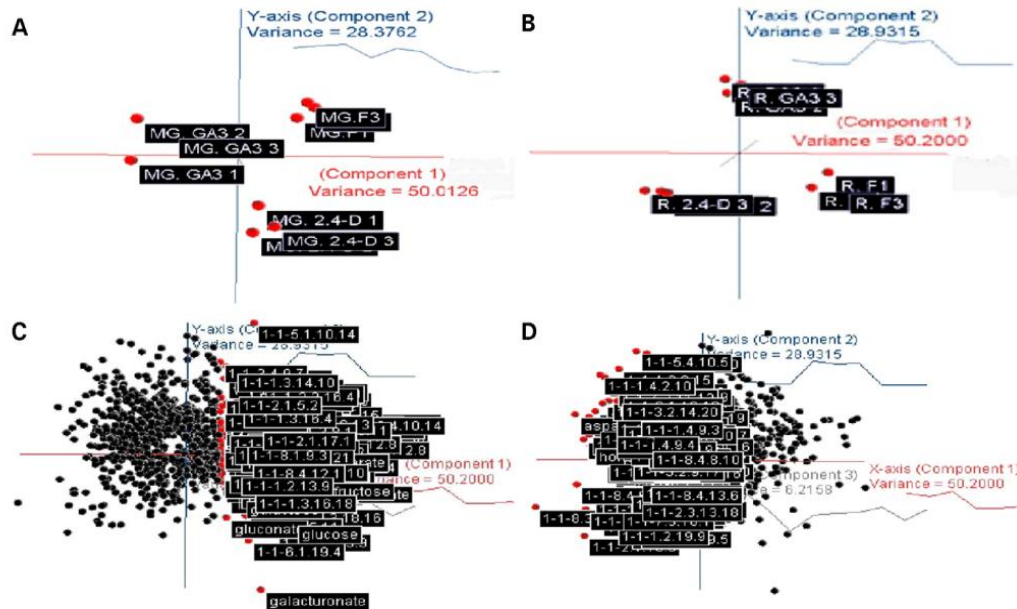


Figura 1.22. Análisis de Componentes Principales (P.C.A.) de transcritos y metabolitos de las muestras correspondientes a pericarpio de frutos en estadio Verde Maduro (MG) (A), y pericarpio de frutos en fase Rojo Maduro (R) (B). En C y D se destacan aquellos transcritos y metabolitos que más contribuyen a la variación representada en la primera componente en el caso de fruto rojo.

En general, los resultados (Tablas TS10-TS13. Anexo I), revelan diferencias a nivel de rutas del metabolismo primario (glucólisis, ciclo TCA, ciclo de Calvin) y secundario (metabolismo de aminoácidos) entre el pericarpio de los frutos partenocárpicos y el pericarpio de frutos fertilizados, lo que sugiere que el tipo de tratamiento hormonal inductor de la fructificación, no solamente afectaría a las fases II y III de crecimiento del fruto, lo que daría lugar a frutos de tamaños distintos, sino que también tiene un efecto sobre el proceso de maduración (fase IV) produciendo frutos con características organolépticas distintas a las de los frutos fertilizados.

#### 1.4. Discusión

En este capítulo, se ha caracterizado inicialmente el desarrollo partenocárpico del fruto a partir del tratamiento exógeno con giberelinas o auxinas con la finalidad de identificar, a nivel transcriptómico, algunos procesos (dirigidos por varios genes) que podrían ser determinantes en el desarrollo del fruto, tanto en sus fases iniciales como durante el proceso de maduración. El análisis de frutos sin semillas, inducidos mediante GAs o auxinas o mediante modificación de la respuesta a GAs, simplifica en principio el sistema de estudio ya que está libre de la interferencia de las semillas. Nuestro interés se centra en identificar los cambios que durante el desarrollo del fruto podrían estar ligados a la acción de estas fitohormonas.

Tradicionalmente, los estudios realizados sobre el desarrollo del tomate se han centrado en el proceso de maduración por diferentes razones sobre todo comerciales, al ser la fase más importante que afecta a las características organolépticas del fruto (Giovannoni, 2001). En cambio, se han estudiado mucho menos las otras fases del desarrollo del fruto, y tan sólo se han descrito unos pocos genes que participan de forma relevante en las fases de desarrollo inicial del mismo (Busi et al., 2003; Joubes et al., 1999). La posibilidad de analizar la expresión simultánea de una gran cantidad de genes mediante la utilización de micromatrices, aplicada al estudio de las fases iniciales del fruto nos permite esclarecer mejor el papel y el mecanismo que tienen las hormonas en este proceso, con una visión más amplia y menos sesgada que la utilizada hasta el momento (Vriezen et al., 2008). De forma complementaria hemos podido identificar parte del programa molecular subyacente al del efecto de la fructificación mediada por hormonas y que repercute en el desarrollo final del fruto.

Los resultados obtenidos en el estudio del desarrollo inicial del fruto, indican que aunque el tratamiento con auxinas produce un transcriptoma claramente diferencial en el estadio 2 dpa (D2), esta diferencia por efecto del tratamiento único inductor se va reduciendo con el tiempo. Ello sugiere que una vez iniciada la fructificación pronto se adquiere un programa de desarrollo del fruto que a nivel transcriptómico parece ser muy similar, con sólo algunas diferencias debidas al propio tratamiento inductor.

El desarrollo inicial del fruto del tomate se caracteriza por un periodo de división celular que se extiende hasta los 6 dpa, seguido por un periodo de expansión que caracteriza los ovarios de 10 dpa a 40 dpa (Gillaspy et al., 1993; Joubes et al., 1999; Lemaire-Chamley et al., 2005). En nuestro estudio, la expresión de genes implicados en procesos de división celular resultó estar activada en los frutos correspondientes a los 2 dpa y 5 dpa. Por otro lado, en el periodo correspondiente con la fase de expansión (12 dpa), el análisis de expresión indicaba que las clases de genes que experimentaban mayores cambios correspondían a los relacionados con los fotosistemas del cloroplasto y de la ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCo).

Los resultados obtenidos en esta parte también parecen indicar que con el inicio de la fructificación y con independencia del estímulo, se produce una importante represión de los



genes implicados con mecanismos de defensa de la planta frente a agresiones externas (bióticas y abióticas). A los 2 dpa, transcritos relacionados con esta categoría (proteínas relacionadas con patogénesis PR P6, PR P4, PR P2, Sn-1, inhibidores de proteasas y diferentes endoquitinasas) ya mostraban una reducción significativa respecto a E0. La actividad de genes implicados en respuestas abióticas o bióticas en los estadíos previos a la fructificación ya se ha observado en tomate (Vriezen et al., 2008). Al parecer la abundancia de estos transcritos es propia de ovarios en fase de antesis o pre-antesis, puesto que estos transcritos también resultan menos abundantes en las muestras E2, E5 y E12. Por el contrario, en las muestras E2-12 se observó una mayor abundancia relativa de transcritos correspondientes a ciertas proteínas de la familia LEA (de "late embryogenesis abundant"). Este tipo de proteínas de tipo chaperona están asociadas a la tolerancia al estrés hídrico resultante de la desecación y del frío, entre otros estreses (Goyal et al., 2005). Estos procesos, junto a la inducción de genes que codifican la expresión de diversos tipos de histonas (H1, H4, H2A y H2B) en los ovarios tratados y fertilizados, sugiere una entrada en fase de división celular en las muestras correspondientes a frutos en desarrollo, mientras que los ovarios no polinizados (E) se mantendrían inicialmente en un estado de dormición/espera en el que aún serían susceptibles de responder al tratamiento hormonal desarrollando un fruto; aunque esa capacidad se va perdiendo con el tiempo (Vriezen et al., 2008). La sensibilidad al tratamiento con 2.4-D y GA<sub>3</sub> de los ovarios emasculados perdura hasta dos semanas después de antesis (Alabadi et al., 1996) y, por lo tanto, la expresión de proteínas de función protectora como las LEA contribuiría a mantener el que la respuesta hormonal todavía fuera posible.

El mayor tamaño de los frutos de 2 dpa tratados con auxinas (ovarios D2), tiene su reflejo en el análisis de categorías funcionales, que reveló una mayor actividad metabólica en ovarios D2 (mayor abundancia de ARNm de histonas, tubulinas y proteínas ribosomales) que en muestras correspondientes a los otros tratamientos. En otros trabajos la inducción de histonas y proteínas ribosomales se ha considerado como una muestra del incremento de la división celular (Wang et al., 2009).

En esta fase inicial, ambos tratamientos hormonales (GAs y auxinas) dieron lugar a un aumento de transcritos de genes relacionados con la actividad transferasa de grupos metilo (S-adenosil-L-metionina sintetasa). La S-adenosil-L-metionina (SAM) es el donante de grupos metilo más utilizado en plantas. La metilación afecta a la estructura de varios metabolitos y tiene un impacto en la movilidad, actividad y/o interacciones con otras moléculas y por lo tanto es un factor de regulación importante. De esta forma, la metilación de GAs, por ejemplo, puede constituir un mecanismo adicional al "feedback" para regular la concentración de hormona GA activa. Además, los metil ésteres son más hidrofóbicos que las formas libres, de manera que pueden atravesar más fácilmente las membranas y tener más movilidad. Una vez en el interior celular se produciría la hidrólisis y se obtendría la forma libre activa de la molécula (Eckardt, 2007).

En ovarios inducidos por giberelina son abundantes transcritos de unión a ARN y de genes que codifican glucosiltransferasas. Estos transcritos se ha comprobado que abundan en el desarrollo

temprano del tejido locular junto con transcritos de proteínas GA20oxidasas y SPINDLY (Lemaire-Chamley et al., 2005).

En cuanto a los genes relacionados con el ciclo celular, el tratamiento con auxinas produjo a los 2 dpa, un incremento en transcritos correspondientes a peptidil-prolil cis-trans isomerasas (PPIasas o Rotamasas) y una quinasa dependiente de ciclina (CDK). Estos aparecieron sobrerrepresentados a partir de los 5 dpa en las muestras tratadas con giberelinas y muestras fertilizadas, sugiriendo una entrada más rápida/eficaz en la fase de división del ciclo celular por efecto de las auxinas.

En ovarios fertilizados P2 se encontraron sobre-expresados de manera significativa, los genes *jasmonic acid 1* y *fbp11*, junto con genes que codifican la expresión de calmodulina. El gen *fbp11* es un gen MADS Box que resulta necesario para conferir identidad de primordio seminal, pero que junto a otros genes de identidad floral como *fbp7* y *TAGL11* son necesarios para el desarrollo de la semilla (Busi et al., 2003; Colombo et al., 1997). Estos datos parecen revelar a nivel transcriptómico el efecto debido al desarrollo embrionario durante estas fases tempranas del inicio de la fructificación en los frutos con semillas (P).

Con la excepción de genes relacionados con el desarrollo de la semilla, las diferencias iniciales a nivel transcriptómico entre los tratamientos se suavizaban a lo largo del desarrollo del fruto, de manera que la variación entre tratamientos se debe principalmente a diferencias en los niveles de expresión de genes correspondientes a procesos comunes.

A los 5 dpa y 12 dpa los transcritos relacionados con los fotosistemas y las reacciones lumínicas (precursor de la proteína de unión 3C a la clorofila a/b, pequeña subunidad 1 de la RuBisCO, precursores de plastocianina), resultaban significativamente sobrerrepresentados, tanto en muestras tratadas como en las fertilizadas. Estudios recientes han sugerido que el desarrollo del fruto se mantendría por el aporte de fotoasimilados procedentes de tejidos fuente como las hojas (Farrar et al., 2000; Nunes-Nesi et al., 2005; Schauer et al., 2005). Sin embargo, la fotosíntesis producida por el propio fruto también parece contribuir de forma considerable a su crecimiento, de hecho la activación de genes relacionados con la fotosíntesis durante esta fase se ha observado en otros estudios transcriptómicos en los que se destaca la importancia de este proceso en el crecimiento del fruto durante estas fases iniciales (Wang et al., 2009). A los 12 dpa los transcritos asociados con metabolismo de carbohidratos (glucosa-1-fosfato adeniltransferasa, sacarosa sintasas, beta-amilasas) glicólisis (fosfoglicerato quinasa (PGK), fosfoenolpiruvato carboxilasa 2, fosfoenolpiruvato hidratasas) y procesos de la pared celular (pectin metilesterasas, precursores de expansinas, celulasas), entre otras categorías, se presentaron como significativos tanto en muestras fertilizadas como en muestras tratadas con hormonas. Por otra parte, fue destacable el número de transcritos de función desconocida o no asignados a una función determinada que se identificaron en las muestras control no tratadas (E) en ambos estadíos (322 transcritos a los 5 dpa y 862 a los 12 dpa), y que mayoritariamente mostraban una expresión incrementada respecto a E0 tanto en las muestras fertilizadas como en

las tratadas con hormonas. Todo ello indica que perdura un gran desconocimiento de muchos de los genes que están implicados el inicio de la fructificación.

En cuanto al efecto sobre las rutas de biosíntesis y señalización hormonal de GAs y auxinas, los bajos niveles de expresión del gen que codifica una enzima ácido ent-kaurenoico oxidasa en ovarios emasculados sin tratar, refuerzan la hipótesis de que la síntesis de GAs es necesaria para el inicio de la fructificación y el crecimiento del fruto (Fos et al., 2000; Serrani et al., 2007). En este trabajo el tratamiento con 2.4-D en estadíos tempranos del desarrollo del fruto, indujo la expresión del gen *SIGA20ox3* y redujo la expresión de un gen *SIGA2ox* que codifica una enzima de inactivación de GAs activas. La acción de las auxinas podría llevarse a cabo a través de los genes Aux/IAA y/o ARF (Frigerio et al., 2006; Serrani et al., 2008). Y de hecho en los ovarios tratados con esta auxina, también se observó la inducción temprana de algunos genes Aux/IAA (*IAA7* y *IAA2*) y de *ARF6* que actúan en la transducción de la señal de auxinas. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en algunos trabajos en los que se ha estudiado la interacción auxinas-GAs (Serrani et al., 2008; Serrani et al., 2007; Vriezen et al., 2008) y que sugieren que el efecto de las auxinas en el desarrollo del fruto estaría mediado en parte por giberelinas.

En este trabajo, el silenciamiento del gen *SIDELLA* produjo niveles elevados de transcritos de proteínas relacionadas con patogénesis (PRP) y de otros genes de defensa en ovarios de 5 dpa y que resultan incluso más acusados en partes vegetativas de las plantas <sup>as</sup>*SIDELLA* (Tabla 1.1. Tablas TS3 y TS4 del Anexo I). Se ha comprobado que la sobre-expresión de algunos de estos genes en los mutantes cuádruples de pérdida de función DELLA en *Arabidopsis*, es responsable de la mayor resistencia de estos mutantes al ataque por determinados patógenos respecto a las plantas silvestres (Navarro et al., 2008). Los resultados sugieren que, a diferencia del tratamiento exógeno con GAs, la desrepresión prolongada del crecimiento (por silenciamiento de *SIDELLA*) produce una respuesta a estrés por parte de la planta. Parte de las proteínas de defensa a estrés por patógenos se inducen por acción del etileno (van Loon et al., 2006), y se ha comprobado que después de la polinización disminuyen los niveles de transcritos de biosíntesis y señalización de etileno en tomate (Vriezen et al., 2008). En los ovarios de 5 dpa <sup>as</sup>*SIDELLA* se encontraron mayores niveles de transcritos de genes de biosíntesis de etileno que los ovarios inducidos por GAs (ver Anexo I. Tabla TS2), y los niveles de expresión de algunos de los genes de respuesta a estrés en ovarios <sup>as</sup>*SIDELLA* de 5 dpa, resultaron similares a los encontrados en los ovarios silvestres en fase de antesis, lo que refuerza la hipótesis de una respuesta a estrés constitutivamente activada debido a la desrepresión continuada del crecimiento en plantas <sup>as</sup>*SIDELLA*, que tal vez se encuentre mediada por etileno.

A los 5 dpa, el silenciamiento de *SIDELLA*, a diferencia del tratamiento inductor con giberelinas, tiene un efecto, no sólo en el mantenimiento de la expresión de genes de defensa a estrés, sino que también produce la inducción de genes que codifican proteínas poligalacturonasas, lo que sugiere una mayor actividad de modificación de la pared celular (Anexo I. Tablas TS2 y TS3), y refuerza la idea de que en estos frutos la fase de expansión asociada a la fase III se activa de

forma más temprana. Esto explicaría las diferencias fenotípicas de los frutos <sup>as</sup>SIDELLA respecto a los inducidos mediante un único tratamiento con giberelinas o los fertilizados (Marti et al., 2007).

En cuanto al efecto sobre las rutas de biosíntesis y señalización hormonal de GAs, en ovarios de 5 dpa de plantas <sup>as</sup>SIDELLA, los niveles de expresión del gen *SIGA20ox3* resultaron menores que en ovarios fertilizados de 5 dpa mientras que los niveles de expresión de un gen *SIGA2ox* de inactivación de GAs, son mayores que en los ovarios silvestres, lo que refuerza la idea de que la expresión de estos genes de la ruta de síntesis de GAs está regulada mediante un mecanismo “feedback” (Hedden and Phillips, 2000; Marti et al., 2007). No se observó lo mismo en el caso del gen que codifica la enzima ácido ent-kaurenoico oxidasa (KAO) cuya expresión parece inducirse mediante la acción de las GAs, y que aunque interviene en la síntesis de estas hormonas no se regularía mediante el mismo mecanismo. Es posible que en ovarios <sup>as</sup>SIDELLA en los que la respuesta a estrés biótico se encuentra activada, la acción de las GAs estuviera activando la síntesis de compuestos que actúan como fitoalexinas a través de KAO, puesto que se ha comprobado que esta enzima puede estar implicada en la síntesis de estos compuestos diterpénicos (Sakamoto et al., 2004).

El efecto del tratamiento exógeno con GA<sub>3</sub> resultó tener un mayor efecto que el silenciamiento del gen *SIDELLA* sobre la inducción de genes relacionados con inhibidores de proteasas y una mayor actividad de los genes de su propia biosíntesis (*ácido ent-kaurenoico oxidasa*, *SIGA20ox-3* y *SIGA2ox*). Este efecto se observa principalmente sobre la regulación del gen *SIGA2ox* cuyo transcrito es más abundante en ovarios de 5 dpa inducidos mediante GA<sub>3</sub>. Las escasas diferencias en los niveles de expresión de los genes IAA7, IAA2 y ARF6 entre frutos <sup>as</sup>SIDELLA y frutos inducidos mediante tratamiento con GA<sub>3</sub>, contribuyen a reforzar la idea de una actuación “aguas abajo” de las GAs con respecto a la acción de las auxinas en la formación del fruto (Serrani et al., 2008; Serrani et al., 2007; Vriezen et al., 2008), puesto que como ya se ha descrito anteriormente, la expresión de estos genes se induce mediante el tratamiento con 2.4-D. Las diferencias a nivel transcriptómico entre ambos tipos de fruto partenocárpico (el inducido mediante tratamiento con GA<sub>3</sub> y el fruto de las plantas <sup>as</sup>SIDELLA), están de acuerdo con lo descrito en relación a las características morfológicas particulares del fruto en las plantas <sup>as</sup>SIDELLA, que ya sugerían un mecanismo de actuación diferente al desencadenado por el tratamiento exógeno con GAs en la formación del fruto (Marti et al., 2007).

De manera similar a los resultados obtenidos en el estudio de las fases tempranas del desarrollo, los PCAs de transcritos de frutos maduros produjeron un agrupamiento de las muestras de pericarpo en función del estadio de maduración. Esto indica un mayor peso de la variación debida al proceso de desarrollo que la producida por el tratamiento inductor con fitohormonas o por el proceso de fertilización. Sin embargo, esta pequeña variación entre tratamientos (que se aplicaron una sola vez en ovarios en fase de anthesis), resultó suficiente para obtener frutos que son distintos, tanto a nivel morfológico como a nivel de contenido de metabolitos en el pericarpo.

Los resultados del PCA de transcritos (Figura 1.21) mostraron que aunque la mayor variación (82.9%) se debía a los estadíos de maduración (Verde Maduro o Rojo Maduro), un 6.6% de la variabilidad se explicaba por las mayores diferencias que a nivel transcriptómico se observaron entre pericarpo de frutos fertilizados y el de los frutos inducidos por tratamiento hormonal. El pericarpo de estos últimos se caracterizaría por tener activada la respuesta frente a patógenos (endoquitinasas y PRPs), la expresión de factores de transcripción y percepción de etileno y por deficiencias en procesos de modificación de pared celular, biosíntesis de carbohidratos, biosíntesis de etileno y otros factores de maduración (Figura 1.21B).

En frutos en estadio Verde Maduro, el PCA de transcritos y metabolitos mostró que la mayor variabilidad se producía entre el pericarpo de frutos inducidos mediante GA<sub>3</sub> y el pericarpo de frutos fertilizados. En los frutos inducidos mediante giberelinas es interesante observar mayores niveles de expresión de *SIGA2ox* y por el contrario niveles menores de *SIGA20ox* que en frutos fertilizados, lo que sugiere una mayor actividad de los genes de respuesta a giberelinas que estarían regulando la expresión de estos genes de biosíntesis.

El análisis de categorías funcionales del estadío Verde Maduro reveló que el tratamiento inductor con GA<sub>3</sub> o auxina produce mayores niveles de transcritos relacionados con respuesta a estrés biótico/abiótico y catabolismo de pared celular de hongos (proteínas PRPs, Sn-1, quitinasas) en pericarpo de frutos inducidos con hormonas que en pericarpo de frutos fertilizados, lo que confirma los resultados obtenidos con el mutante <sup>as</sup>SIDELLA y sugiere la activación de determinados mecanismos de defensa en respuesta a la desrepresión del crecimiento. Estos mecanismos de defensa, si bien no parecen activos en las fases iniciales del desarrollo del fruto inducido puntualmente por fitohormonas, sí que se encontrarían activos en ovarios <sup>as</sup>SIDELLA como consecuencia del silenciamiento constitutivo del gen represor *SIDELLA*.

En el pericarpo en fase Verde Maduro de frutos fertilizados, hay mayor expresión de genes relacionados con la síntesis y señalización de etileno, como el gen que codifica la proteína E8 (relacionada con la biosíntesis de etileno), y de genes que codifican proteínas relacionadas con modificación de pared celular (pectinesterasas, xiloglucano endotransglucosidasas, expansinas). El pericarpo de frutos inducidos por GA<sub>3</sub> sin embargo, presenta mayores niveles de transcritos de ACC oxidasa 1.

En cuanto a metabolitos, el pericarpo inducido mediante GA<sub>3</sub> presenta las mayores diferencias con el pericarpo de frutos fertilizados presentando concentraciones significativamente alteradas de metabolitos pertenecientes al metabolismo primario (Ciclo de Calvin, glucólisis y ciclo de los ácidos tricarboxílicos o TCA). Lo más destacable en pericarpo Verde Maduro de muestras inducidas mediante GA<sub>3</sub>, es la elevada cantidad de glucosa 6-fosfato, fructosa-6-fosfato e inositol 1-fosfato respecto a frutos fertilizados y frutos inducidos por auxina (Tabla 1.4). El pericarpo Verde Maduro de los frutos inducidos por auxina muestra una mayor abundancia de metabolitos intermediarios del ciclo TCA (principalmente succinato y fumarato), respecto al de los fertilizados. Sin embargo estas discrepancias no ocurren a nivel de azúcares, observándose

similitudes en las cantidades detectadas de hexosas fosfato y glucosa entre el pericarpo de estos frutos y el de los frutos fertilizados (Tabla 1.4). Los intermediarios del ciclo TCA, al igual que ocurre con las hexosas fosfato, disminuyen durante la maduración (Carrari and Fernie, 2006) e incluso se ha descrito un aumento de pigmentación en genotipos de tomate deficientes en la función del ciclo TCA (Carrari et al., 2003). La acumulación de estos compuestos (hexosas fosfato e intermediarios del ciclo TCA) en el pericarpo de frutos inducidos mediante tratamiento hormonal, sugiere una menor eficiencia respiratoria en estos frutos respecto al pericarpo de fruto fertilizado o un estadio de maduración menos avanzado cuando se recogieron los frutos.

La fase de fruto Rojo Maduro es sin embargo, más fácilmente identificable debido en gran parte a la acumulación de licopeno, lo que da lugar a una mayor robustez y seguridad con los análisis de rutas metabólicas. En el pericarpo de este tipo de frutos se observa una mayor abundancia de transcritos relacionados con la degradación de aminoácidos (principalmente Histidina descarboxilasas) en muestras fertilizadas, posiblemente para la producción de compuestos aromáticos asociados a la maduración, y de transcritos relacionados con la modificación de pared celular (poligalacturonasas, pectinesterasas) que en el de frutos inducidos mediante tratamiento hormonal -especialmente respecto a los inducidos por auxina. En muestras inducidas con GA<sub>3</sub>, se mantienen los mayores niveles de transcritos de ACCoxidasas 1 que en frutos fertilizados y tratados con auxina, lo que sugiere una mayor actividad de síntesis de etileno en pericarpo de frutos inducidos por giberelinas.

Los resultados también muestran una mayor abundancia relativa de transcritos relacionados con la degradación de sacarosa (sacarosa sintasa, fosfoenolglucosa quinasa) en pericarpo de frutos inducidos por GAs. La sacarosa sintasa (SuS) es un enzima clave en el desarrollo del fruto de tomate (D'Aoust et al., 1999), sin embargo su actividad es más importante en los estadios iniciales del desarrollo del fruto hasta los 30 dpa, en los que el aporte de sacarosa se produce de manera simplástica, posteriormente el aporte apoplástico y las enzimas invertasas adquieren más protagonismo en el importe y degradación de sacarosa (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001). El mayor protagonismo de SuS, y la menor eficiencia en la degradación de sacarosa en relación con las invertasas vacuolares o apoplásticas que actúan en esta fase de desarrollo del fruto, podrían explicar los mayores niveles de sacarosa (3 veces más que en fertilizados) y el reducido tamaño de los frutos inducidos por GA<sub>3</sub>, ya que cambios en los niveles de expresión de sacarosa sintasa, así como de determinadas invertasas, afectan tanto al contenido en sólidos solubles (% Brix) como al tamaño del fruto (Baxter et al., 2005; D'Aoust et al., 1999; Klann et al., 1996).

En fase de Rojo Maduro los niveles de hexosas fosfato (glucosa 6-fosfato, fructosa-6-fosfato) son al menos 300 veces más altas en pericarpo de frutos inducidos por fitohormonas que en frutos fertilizados (Tabla 1.3), donde los niveles de estos compuestos están por debajo del nivel de detección. La gran abundancia relativa de hexosas fosfato en pericarpo de frutos inducidos por tratamiento hormonal, sugiere una considerable actividad de enzimas hexoquinasas que debería ser muy reducida en frutos en estadio Rojo Maduro (Roessner-Tunali et al., 2003). Los resultados obtenidos a nivel transcriptómico indican una mayor actividad de algunos enzimas de

la glucólisis como fosfofructoquinasa (fructosa 6-P→fructosa1-6-PP) y aldolasa (fructosa1-6-PP →Triosas-P) en pericarpo de frutos inducidos por fitohormonas, lo que sugiere una mayor actividad glucolítica en el pericarpo de estos frutos respecto al pericarpo de frutos fertilizados.

En el estadio de fruto Rojo Maduro, los bajos niveles de expresión relativos a los del fruto fertilizado de los genes que codifican enzimas de modificación de pared celular (poligalacturonasas, pectato-liasa, endo-beta-manasa, celulasa, XET) encontrados en los frutos inducidos mediante tratamiento hormonal, sobretodo inducidos mediante 2.4-D, coinciden con una mayor dureza y consistencia del pericarpo de estos frutos (resultados no mostrados). Esto indicaría un retraso en la maduración del pericarpo de los frutos partenocárpicos respecto a los frutos fertilizados, si bien no en cuanto al color del fruto, sí en cuanto a los procesos de modificación de pared celular que determinan el ablandamiento del mismo (Carrari and Fernie, 2006). Además, el pericarpo de estos frutos muestra mayores niveles de transcritos del ciclo de Calvin (como fosforibuloquinasa, RuBisCo) indicativos de una mayor actividad fotosintética del pericarpo de estos frutos en relación al de los frutos fertilizados.

El % Brix es mayor en pericarpo de frutos inducidos por 2.4-D (Anexo I. Figura FS2) Un porcentaje alto en grados Brix (o de sólidos solubles) es el resultado de elevadas cantidades de sacarosa y glucosa, junto con una contribución menor de aminoácidos aspartato y alanina (Baxter et al., 2005). El pericarpo Rojo Maduro de frutos inducidos mediante tratamiento hormonal, contiene una cantidad significativamente más elevada de sacarosa (2-3 veces) y de aspartato (2-5 veces) que en frutos fertilizados. No obstante, lo que podría contribuir de manera más significativa al incremento de grados Brix en frutos inducidos por fitohormonas es la elevada concentración relativa de algunos aminoácidos (principalmente arginina, ornitina y prolina) encontrada en el pericarpo de estos frutos y que resulta prácticamente indetectable en pericarpo de frutos fertilizados. El incremento en la concentración de ciertos aminoácidos se ha observado en plantas de tomate que sobre-expresan hexoquinasa y se atribuye a un fraccionamiento de la ruta glucolítica hacia la síntesis de estos aminoácidos (Roessner-Tunali et al., 2003). El pericarpo de los frutos inducidos por hormonas presentaría por tanto, importantes alteraciones en el metabolismo de aminoácidos en relación al pericarpo de frutos fertilizados, que podría deberse a la acumulación de sacarosa y hexosas fosfato. Estas alteraciones serían más importantes en el pericarpo de frutos tratados con auxinas, en el que se observa una mayor abundancia relativa de algunos aminoácidos, lo que explicaría su mayor contenido en sólidos solubles. A nivel transcriptómico, estos resultados coinciden con una menor actividad en el metabolismo de aminoácidos (como arginina y glutamato descarboxilasas, aminotransferasas), principalmente en muestras inducidas por auxinas (Anexo I. Tablas TS12-TS13).

El etileno regula ciertos mecanismos relacionados con el proceso de maduración, que actúan tanto a nivel morfológico como bioquímico (Alba et al., 2005). Los resultados del análisis transcriptómico en pericarpo de frutos partenocárpicos inducidos por tratamiento hormonal en fase Verde Maduro (Tablas TS6, TS10 y TS12. Anexo I), revelan alteraciones significativas en la expresión de genes relacionados con la síntesis de etileno (principalmente ACC oxidasas), y las

características metabólicas descritas anteriormente en el pericarpo de estos frutos, podrían deberse a alteraciones en la síntesis o modo de acción de esta hormona. El pericarpo de los frutos inducidos por tratamiento hormonal, también muestra bajos niveles significativos de transcritos correspondientes a enzimas GA20 oxidasas con respecto al pericarpo de frutos fertilizados, lo que sugiere un papel de las giberelinas en la maduración del pericarpo aparte del descrito en la diferenciación y desarrollo del tejido locular (Lemaire-Chamley et al., 2005).

En definitiva los análisis tanto transcriptómico como metabólico del pericarpo de los frutos inducidos por tratamiento hormonal, revelan que la formación de la semilla (y los correspondientes estímulos hormonales asociados a su desarrollo), afectaría no solamente al tamaño del fruto (los frutos más grandes suelen contener semillas) sino también al control del metabolismo de la pared, de azúcares y del metabolismo secundario y determina de esta manera las propiedades organolépticas que le otorgan al fruto su particular atractivo.



Anexo I

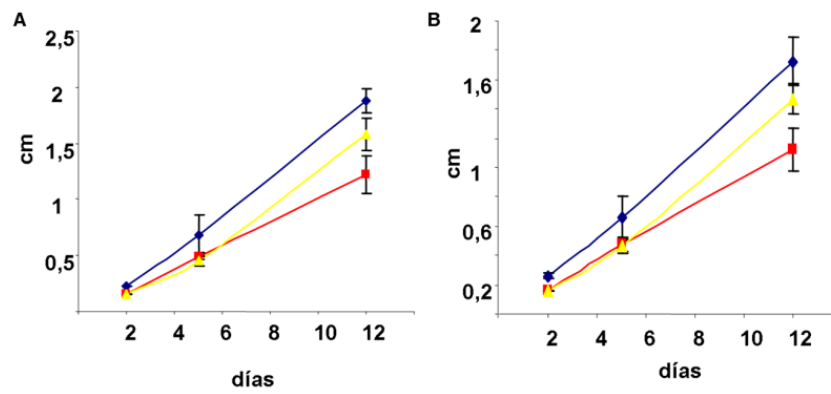


Figura FS1 Efecto del tratamiento hormonal sobre el tamaño de los frutos de *S. lycopersicum* var. Microtom tanto en el diámetro del fruto (A) como en la longitud (B). Colores: Amarillo: muestras P (ovarios fertilizados). Rojo: muestras G (ovarios tratados con GA<sub>3</sub>). Azul: muestras D (ovarios tratados con auxina).

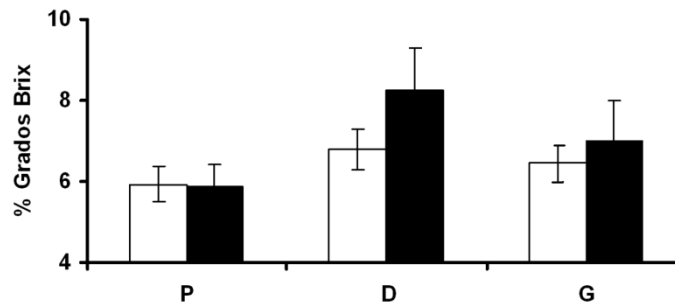


Figura FS2. Representación del % de grados Brix determinados en pericarpo de frutos fertilizados (P), inducidos por auxina (D) e inducidos por GAs (G), en frutos en estadio de Verde Maduro (barras blancas) y en frutos en Rojo Maduro (barras negras). Las barras representan la media de tres réplicas independientes +/- SD.

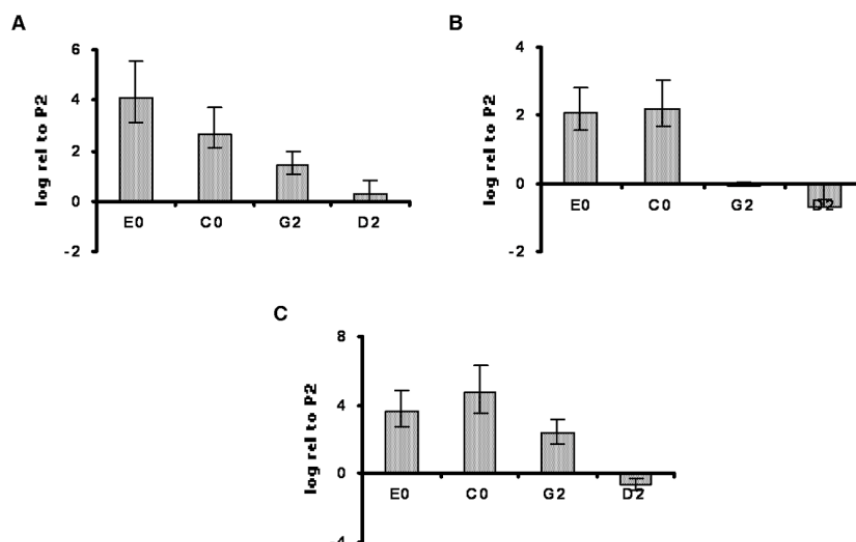


Figura FS3. Representaciones de los niveles de expresión resultado de las RT-PCRq de tres genes que codifican (A) la proteína relacionada con procesos de patogénesis PRP2 (SGN-U145399), e inhibidores de proteasas SGN-U212874 y SGN-U213613 (B y C). Los valores de expresión son relativos a los de P2 (ovario fertilizado recogido 2 dpa). E0: ovario en fase de antesis emasculado el día anterior a la antesis, C0: ovario en antesis no emasculado, G2: ovario tratado con GA<sub>3</sub> de 2 dpa y D2: ovario tratado con 2.4-D de 2 dpa.

Tabla TS1. Categorías funcionales representadas por los genes sobre-expresados respecto a E0 en las muestras D2. Se representa el P-valor crudo y el corregido (Bonferroni).

Categoría Ontológica	Frecuencia en el grupo	Frecuencia en la micromatriz	P-valor crudo	P-valor corregido
Procesos celulares	47 de 134 genes, 35.1%	1993 de 13440 genes, 14.8%	4.05e-09	0
Procesos metabólicos	45 de 134 genes, 33.6%	2451 de 13440 genes, 18.2%	1.43e-05	0
Procesos de biosíntesis de macromoléculas	19 de 134 genes, 14.2%	403 de 13440 genes, 3.0%	1.78e-08	0
Expresión génica	17 de 134 genes, 12.7%	373 de 13440 genes, 2.8%	1.74e-07	0
Remodelación de la cromatina	6 de 134 genes, 4.5%	36 de 13440 genes, 0.3%	1.33e-06	0
Transporte	11 de 134 genes, 8.2%	385 de 13440 genes, 2.9%	0.002	0.015
Biosíntesis de carbohidratos	3 de 134 genes, 2.2%	47 de 13440 genes, 0.3%	0.011	0.036

Tabla TS2. Categorías sobrerrepresentadas en los sectores de la Figura 1.18. El P-valor es el corregido (Bonferroni).

TGAS/G5 (80)		Comunes (1600)		G5/TGAS (187)	
Categorías (Procesos)	P-valor	Categorías (Procesos)	P-valor	Categorías (Función)	P-valor
carbohydrate catabolic process	7.79E-05	photosynthesis	7.50E-03	endopeptidase inhibitor activity	6.05E-11
ethylene biosynthetic process	3.67E-04	histone ubiquitination	0.01	protease inhibitor activity	6.05E-11
response to stress	0.00179				
response to stimulus	0.04667				
cell wall modification	0.04857				

Tabla TS3. Genes sobre-expresados (log M>0.05) en ovarios de 5 dpa de plantas <sup>as</sup>SIDELLA respecto a ovarios 5 dpa silvestres.

SGN-U	TGAS/Wt	Anotación	P-valor
145000	1.26	wound-induced protein (clone TAB7)	0.007541
143291	1.215	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0.003648
145000	1.17	wound-induced protein (clone TAB7)	0.002704
144585	1.094	unknown protein, T25K17.70	0.037628
No sequence	0.956		0.046632
145272	0.939	wound-induced protein Sn-1, vacuolar membrane	0.016005
No sequence	0.933		0.045728
145000	0.92	wound-induced protein (clone TAB7)	0.002834
144558	0.888	sequence homology, OSJNBa0093F12.14	0.016789
No sequence	0.83		0.040793
145272	0.823	wound-induced protein Sn-1, vacuolar membrane	0.027083
145272	0.817	wound-induced protein Sn-1, vacuolar membrane	0.014306
149666	0.764	wound-induced protein Sn-1, vacuolar membrane	0.009275
143880	0.725	CER1 protein	0.001985
143242	0.624	Pathogenesis-related leaf protein 6 precursor (P6)	0.032871
150692	0.566	Dof zinc finger protein	0.054031
143338	0.564	Basic 30 kDa endochitinase precursor	0.002512
143338	0.548	Basic 30 kDa endochitinase precursor	0.027575
146189	0.536	unknown protein	0.00375
No sequence	0.534		0.01427

Tabla TS4. Genes sobre-expresados (log M>0.05) en entrenudo de plantas <sup>as</sup>SIDELLA respecto a entrenudo de plantas silvestres.

SGN-U	TGAS/Wt	Anotación	P-valor
145399	2.94	Pathogenesis-related protein P2 precursor	0.0000
145399	2.938	Pathogenesis-related protein P2 precursor	0.0003
144297	2.722	Acidic 26 kDa endochitinase precursor	0.0003
144863	2.696	1,3-beta-glucanase (EC 3.2.1.-), basic	0.0001
144297	2.492	Acidic 26 kDa endochitinase precursor	0.0008
143238	2.415	Pathogenesis-related leaf protein 4 precursor (P4)	0.0091
144297	2.363	Acidic 26 kDa endochitinase precursor	0.0021
No sequence	2.351		0.0018
144109	2.288	lipid transfer protein LTP1 precursor	0.0054
143242	2.274	Pathogenesis-related leaf protein 6	0.0095
143242	2.196	Pathogenesis-related leaf protein 6	0.0220
144109	2.193	lipid transfer protein LTP1 precursor	0.0079
No sequence	2.183		0.0221
143242	2.154	Pathogenesis-related leaf protein 6	0.0166
144297	2.149	Acidic 26 kDa endochitinase precursor	0.0011
143238	2.122	Pathogenesis-related leaf protein 4 precursor (P4)	0.0051
143242	2.098	Pathogenesis-related leaf protein 6	0.0107
145399	2.079	Pathogenesis-related protein P2 precursor	0.0003
155538	2.077	RuBisCO	0.0146
No sequence	2.067		0.0230
143242	2.045	Pathogenesis-related leaf protein 6	0.0213
No sequence	2.035		0.0203
144470	2.034	Hydroquinone glucosyltransferase (Arbutin synthase)	0.0173
No sequence	2.031		0.0050
143838	2.002	pathogenesis-related protein PR-1 precursor	0.0055
No sequence	1.98		0.0072
145000	1.907	wound-induced protein (clone TAB7) (fragment)	0.0032
147573	1.907	oxygen-evolving complex 25.6 kD protein	0.0302
145000	1.9	wound-induced protein (clone TAB7) (fragment)	0.0014
No sequence	1.88		0.0072
157647	1.833	hypothetical protein	0.0232
No sequence	1.791		0.0111
143242	1.748	Pathogenesis-related leaf protein 6	0.0439
No sequence	1.725		0.0003
No sequence	1.724		0.0341

No sequence	1.677		0.0384
145000	1.675	wound-induced protein (clone TAB7) (fragment)	0.0010
146264	1.649	SYM10 protein	0.0037
143880	1.604	CER1 protein	0.0013
143838	1.576	pathogenesis-related protein PR-1 precursor	0.0004
146264	1.557	SYM10 protein	0.0025
No sequence	1.552		0.0119
147602	1.543	wound-induced protein Sn-1, vacuolar membrane	0.0072
No sequence	1.539		0.0057
147892	1.466	myb-related transcription factor	0.0316
147557	1.358	DnaJ-like protein	0.0049
143518	1.356	TSI-1 protein	0.0038
No sequence	1.337		0.0039
No sequence	1.331		0.0035
143242	1.316	Pathogenesis-related leaf protein 6	0.0544
No sequence	1.303		0.0160
No sequence	1.28		0.0001
144826	1.272	Pathogenesis-related protein STH-2	0.0462
147082	1.27	growth-on protein GRO10	0.0019
161922	1.253	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase A precursor	0.0005
No sequence	1.235		0.0297
143928	1.211	xyloglucan endotransglycosylase (XTR4), putative	0.0013
143518	1.201	TSI-1 protein	0.0065
No sequence	1.196		0.0136
No sequence	1.139		0.0108
No sequence	1.104		0.0501
143928	1.083	xyloglucan endotransglycosylase (XTR4), putative	0.0003
143280	1.046	Pathogenesis-related protein 1	0.0299
145924	1.036	lipase, putative	0.0364
144659	1.032	Histone H4	0.0357
150997	1.024	NADPH oxidase; gp91; phox homolog	0.0061
143280	1.018	Pathogenesis-related protein 1	0.0153
146264	1.007	SYM10 protein	0.0003
146679	0.991	putative sorbitol transporter	0.0149
148436	0.989	hexose transporter	0.0085
143518	0.989	TSI-1 protein	0.0086
No sequence	0.973		0.0123
No sequence	0.956		0.0100
151602	0.95	No hits found	0.0420
149620	0.947	transmembrane protein	0.0193
No sequence	0.946		0.0429
151654	0.941	unknown protein	0.0426
144836	0.909	Kelch repeat containing F-box protein family	0.0006
150670	0.902	expressed protein	0.0019
147510	0.882	unknown protein	0.0366
143275	0.882	ACC oxidase 4	0.0129
143518	0.88	TSI-1 protein	0.0071
143283	0.879	putative glutathione S-transferase T2	0.0039
No sequence	0.862		0.0264
144946	0.861	TMV response-related gene product	0.0058
145346	0.838	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	0.0379
146189	0.818	expressed protein	0.0084
145995	0.814	dual-specificity protein phosphatase-like protein	0.0344
No sequence	0.792		0.0008
146189	0.79	expressed protein	0.0292
145412	0.79	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family	0.0242
152291	0.772	auxin-induced (indole-3-acetic acid induced)	0.0029
152645	0.763	catechol oxidase (EC 1.10.3.1) precursor	0.0169
145924	0.755	lipase, putative	0.0021
No sequence	0.75		0.0165
146287	0.748	P0019D06.12	0.0110
156774	0.741	cytochrome P450	0.0099
144420	0.737	bZIP transcription factor ATB2	0.0160
No sequence	0.736		0.0023
144488	0.727	OSMOTIN-LIKE PROTEIN	0.0201
143286	0.721	Pathogenesis-related protein 1	0.0105
143291	0.72	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPlase)	0.0091
No sequence	0.709		0.0245
149807	0.698	Homeobox-leucine zipper protein HAT22	0.0528

144894	0.692	Histone H2A	0.0220
149215	0.681	expressed protein	0.0103
143274	0.676	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1	0.0274
149620	0.674	transmembrane protein	0.0098
154316	0.672	putative protein kinase Xa21, receptor	0.0090
No sequence	0.672		0.0247
No sequence	0.655		0.0355
148041	0.649	OSJNBa0070M12.15	0.0271
No sequence	0.648		0.0068
143838	0.644	pathogenesis-related protein PR-1 precursor	0.0097
150891	0.634	MCM3 protein	0.0040
No sequence	0.624		0.0220
No sequence	0.618		0.0241
No sequence	0.606		0.0284
Potential chimera	0.599		0.0483
170546	0.597	No hits found	0.0542
No sequence	0.595		0.0029
143338	0.591	Basic 30 kDa endochitinase precursor	0.0388
143713	0.591	Polygalacturonase 2A precursor (PG-2A) (Pectinase)	0.0104
145358	0.571	pectinesterase (EC 3.1.1.11) PECS-c2	0.0112
149620	0.57	transmembrane protein	0.0028
145172	0.564	protein kinase, putative	0.0431
143227	0.56	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family	0.0232
144245	0.555	AKIN gamma	0.0223
143414	0.55	Pathogenesis-related protein PR P23	0.0151
151526	0.541	sequence homology, OSJNBb0051N19.8	0.0139
154435	0.531	F-box protein (SKP1 interacting partner 3-related)	0.0168
144215	0.531	mucin-like glycoprotein 900	0.0297
No sequence	0.525		0.0406
145148	0.512	histone H2A-like protein	0.0364

Tabla TS5. Valores extremos de la 1ª Componente que explica el 82,5% de la variabilidad. Los valores positivos corresponderían a transcritos con más peso en el estadio de maduración rojo, mientras que los valores negativos corresponderían a transcritos con mayor influencia en el estadio de maduración correspondiente al fruto verde maduro.

ID	Anotación	PCA (Componente 1)
1-1-3.4.12.8	Polygalacturonase 2A precursor (PG-2A)	8.20
1-1-1.3.19.11	Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	7.45
1-1-2.2.6.15	proteasome inhibitor	6.93
1-1-3.4.6.13	plastid terminal oxidase	6.78
1-1-7.1.8.8	Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	6.31
1-1-2.4.19.15	Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	6.15
1-1-5.1.8.8	Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	6.06
1-1-5.2.12.11	Phytoene synthase 1, chloroplast precursor	6.00
1-1-5.4.8.14	phytoene synthase (EC 2.5.1.-) - tomato	5.91
1-1-8.3.8.2	vacuolar invertase, beta-fructofuranosidase	5.86
1-1-8.4.1.21	xyloglucan endotransglycosylase LeXET2	-3.87
1-1-8.2.12.19	RuBisCO small subunit 3A/3C	-3.95
1-1-2.2.10.8	RuBisCO small subunit 3A/3C	-4.00
1-1-1.1.1.21	aldolase, plastidic	-4.13
1-1-5.4.10.10	RuBisCO small subunit 3A/3C	-4.22
1-1-4.1.4.19	cytochrome P450, elicitor-inducible	-4.25
1-1-1.3.10.11	Ethylene-responsive proteinase inhibitor	-4.55
1-1-6.4.15.14	lipid transfer protein 2	-4.73
1-1-5.4.14.7	VAMP protein SEC22	-5.16
1-1-5.4.12.12	No apical meristem (NAM) protein	-6.33

Tabla TS6. Genes de expresión significativa en pericarpo de tomate en fase Verde Maduro (MG) en inducidos por GA<sub>3</sub> (G) y frutos inducidos por auxina (D), ordenados según el valor de la 1ª Componente (PCA). Los valores de expresión están en forma logarítmica y representan la media de tres réplicas respecto al pericarpo en frutos fertilizados (P).

Anotación	SGN-U	PCA	G (MG)	D (MG)
gibberellin 20-oxidase-3; 20ox-3	SGN-U219631	3.12	-2.51	-1.10
expansin 1	SGN-U215711	2.96	-2.53	-1.74
ACC oxidase homolog (Protein E8)	SGN-U212804	2.76	-2.23	-1.13
cyclin-dependent kinase inhibitor	SGN-U217044	2.67	-2.22	-1.35
purine permease family	SGN-U220873	2.63	-2.15	-0.67
phenylalanyl-trna synthetase - like protein	SGN-U214098	2.53	-2.13	-1.22
cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylase	SGN-U215025	2.49	-1.74	0.16
ACC oxidase homolog (Protein E8)	SGN-U212804	2.45	-2.06	-1.12
Elicitor inducible gene product Nt-SubE80	SGN-U216350	2.40	-1.87	-0.57
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	SGN-U223665	2.33	-2.04	-1.41
pectinesterase (pectin methylesterase) family	SGN-U213493	2.24	-1.68	0.00
ACC oxidase homolog (Protein E8)	SGN-U212799	2.12	-1.82	-1.07
aldehyde dehydrogenase 1 precursor	SGN-U214006	2.09	-1.71	-1.10
calcineurin-like phosphoesterase family	SGN-U220421	2.02	-1.77	-1.41
ultraviolet-B-repressible protein	SGN-U215124	1.95	-1.31	0.23
CTV.2	SGN-U215070	1.87	-1.28	-0.10
ethylene response factor 3	SGN-U214815	1.86	-1.32	-0.19
xylulose kinase	SGN-U221838	1.80	-1.23	-0.22
syringolide-induced protein 19-1-5	SGN-U213043	1.77	-1.28	-0.20
beta-galactosidase	SGN-U217130	1.73	-1.67	-2.12
CBL-interacting protein kinase 1	SGN-U214714	1.73	-1.63	-1.61
pectinesterase (pectin methylesterase) family	SGN-U213492	1.71	-1.34	-0.03
ethylene responsive element binding factor 2 (EREBP-2)	SGN-U223009	1.69	-1.49	-0.67
TDR4 transcription factor	SGN-U213659	1.69	-1.18	-0.23
hin1-like protein	SGN-U213160	1.65	-1.34	-0.23
syringolide-induced protein 19-1-5	SGN-U213044	1.63	-1.14	-0.16
ethylene response factor 3	SGN-U214815	1.63	-1.15	-0.16
Myb-like protein P	SGN-U218469	1.62	-1.25	-0.26
metalloprotease -related	SGN-U217546	1.61	-1.42	-1.00
homeodomain protein	SGN-U213729	1.61	-1.07	0.02
bHLH protein family	SGN-U218130	1.59	-1.10	-0.21
tumor-related protein, clone NF34	SGN-U218260	1.57	-1.40	-0.79
phosphoinositide phosphatase	SGN-U222920	1.55	-1.08	-0.20
WIZZ	SGN-U213244	1.50	-1.21	-0.71
WIZZ	SGN-U213245	1.49	-1.07	-0.34
syringolide-induced protein 19-1-5	SGN-U213044	1.49	-1.04	-0.02
expansin-like protein	SGN-U216141	1.48	-1.17	-0.37
(Lea)-like protein ER5, ethylene-responsive	SGN-U214303	1.48	-1.06	-0.26
glycolate oxidase -related	SGN-U212963	1.47	-1.35	-1.32
hydroxy-acid oxidase, (S)-2-hydroxy-acid oxidase	SGN-U213051	1.45	-1.09	-0.44
glyoxalase I, putative (lactoylglutathione lyase)	SGN-U220344	1.44	-0.91	0.07
TCP family transcription factor, putative	SGN-U224651	1.44	-1.01	-0.16
pectinesterase like protein	SGN-U213494	1.43	-1.04	0.10
hin1-like protein	SGN-U213159	1.40	-1.13	-0.18
short-chain dehydrogenase/reductase family protein	SGN-U217262	1.40	-0.96	-0.24
sulfate transporter	SGN-U222906	1.39	-0.91	0.10
Pto-responsive gene 1 protein	SGN-U214580	1.39	-0.89	0.12
adenosine monophosphate binding protein 1 AMPBP1	SGN-U227888	1.38	-1.03	-0.47
membrane protein	SGN-U216491	1.37	-1.02	-0.35
C-repeat/DRE binding protein, putative	SGN-U227655	1.37	-0.93	-0.12
hin1-like protein	SGN-U213159	1.37	-1.08	-0.40
RISBZ4	SGN-U216311	1.36	-0.96	-0.13
NAC domain protein NAC1	SGN-U219491	1.35	-1.00	-0.24
shaggy protein kinase 4 (EC 2.7.1.-)	SGN-U213944	1.35	-0.95	-0.23
syringolide-induced protein 19-1-5	SGN-U213044	1.34	-0.99	-0.12
WRKY family transcription factor	SGN-U212725	1.34	-1.01	-0.17
CBL-interacting protein kinase 14	SGN-U215143	1.33	-1.14	-0.70
Serine/threonine Kinase	SGN-U213441	1.31	-0.90	-0.03
zinc finger protein, putative	SGN-U221953	1.31	-0.87	-0.05
SINA2 protein	SGN-U215951	1.31	-0.70	0.68
heat shock protein family	SGN-U221276	1.31	-0.88	-0.11
mitogen activated protein-K,K,K	SGN-U218167	1.31	-0.90	-0.19
bZIP transcriptional activator RSG	SGN-U229094	1.30	-1.17	-1.32
glycerol-3-phosphate acyltransferase	SGN-U220664	1.29	-0.68	0.76

WRKY family transcription factor	SGN-U215688	1.26	-0.89	-0.21
metalloprotease -related	SGN-U217546	1.26	-1.13	-0.92
cold-induced glucosyl transferase	SGN-U213190	1.25	-0.61	0.87
endosomal protein-like	SGN-U221899	1.25	-0.84	-0.07
late-embryogenesis protein lea5	SGN-U213707	1.24	-1.12	-0.70
arginine decarboxylase 1	SGN-U213123	1.24	-1.02	-0.35
arginine-tRNA-protein transferase 1 homolog	SGN-U218252	1.24	-0.86	-0.16
Serine/threonine Kinase	SGN-U213441	1.23	-0.84	-0.05
ferredoxin-NADP+ oxidoreductase, chloroplast	SGN-U225240	1.21	-0.93	-0.44
metal transporter family	SGN-U218030	1.21	-0.83	-0.15
RuBisCO small subunit 3A/3C	SGN-U225521	1.20	-0.87	-0.13
amine oxidase family	SGN-U214101	1.20	-0.86	-0.18
LEXYL2	SGN-U214621	1.20	-0.89	-0.19
remorin-like protein	SGN-U215941	1.19	-0.86	-0.20
syringolide-induced protein 19-1-5	SGN-U213044	1.19	-0.80	0.14
ascorbate peroxidase, thylakoid-bound	SGN-U214170	1.18	-0.79	0.19
signal peptidase I -related	SGN-U215915	1.17	-0.81	-0.21
Serine/Threonine protein kinase	SGN-U223413	1.17	-0.82	-0.20
WRKY-type transcription factor	SGN-U214599	1.17	-0.98	-0.58
GMP synthase	SGN-U228906	1.17	-0.74	0.02
glutamate decarboxylase isozyme 1	SGN-U212549	1.16	-0.49	1.17
MADS-box protein 15	SGN-U215264	1.16	-0.80	-0.08
Calcium-binding protein CAST	SGN-U217799	1.16	-0.93	-0.47
helicase-like transcription factor	SGN-U220756	1.15	-0.78	-0.09
DEDOL-PP synthase	SGN-U220011	1.14	-0.79	-0.21
boron transporter	SGN-U216363	1.14	-0.80	0.00
late-embryogenesis protein homolog	SGN-U212930	1.13	-0.74	0.01
photosystem I reaction center subunit	SGN-U213389	1.13	-0.64	0.33
auxin-induced (indole-3-acetic acid induced) protein	SGN-U221035	1.13	-0.71	0.07
glycosyltransferase family 2	SGN-U214567	1.13	-1.11	-0.90
ACC oxidase homolog (Protein E8)	SGN-U212799	1.12	-0.89	-0.42
NAD-dependent epimerase/dehydratase family	SGN-U215146	1.11	-0.79	-0.10
Epidermis-specific secreted glycoprotein EP1 precursor	SGN-U213319	1.11	-0.77	-0.15
cysteine protease	SGN-U213770	1.10	-0.73	-0.08
3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase	SGN-U221491	1.09	-0.75	-0.14
U2 snRNP protein A'	SGN-U215752	1.08	-0.70	0.02
Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 284	SGN-U215995	1.08	-0.81	-0.26
cold-induced glucosyl transferase	SGN-U213190	1.08	-0.40	1.43
WRKY family transcription factor	SGN-U212725	1.07	-0.80	-0.30
Intracellular ribonuclease LX precursor (RNase LX)	SGN-U219709	1.07	-0.71	-0.01
heavy-metal-associated domain-containing protein	SGN-U216037	1.06	-0.78	-0.17
WIZZ	SGN-U213245	1.05	-0.91	-0.48
WRKY family transcription factor	SGN-U220144	1.05	-0.71	0.05
glutamate decarboxylase isozyme 1	SGN-U212549	1.05	-0.26	1.96
AG-motif binding protein-4	SGN-U216318	1.05	-0.73	-0.17
aldose 1-epimerase family	SGN-U217631	1.04	-0.72	-0.04
threonyl-tRNA synthetase	SGN-U216689	1.02	-0.62	0.26
calcium-transporting ATPase	SGN-U216601	1.02	-0.74	-0.27
respiratory burst oxidase homolog	SGN-U223281	1.01	-0.67	0.01
PHYA, LePHYA, phytochrome A	SGN-U229770	1.01	-0.66	0.03
transcription factor Pti4	SGN-U216022	1.01	-0.69	0.04
DNA-binding protein NtWRKY3	SGN-U215729	1.01	-0.95	-0.77
peroxidase	SGN-U219659	1.00	-0.77	-0.49
galactosyltransferase family	SGN-U215804	-1.01	0.86	0.34
Pathogenesis-related protein STH-2	SGN-U214460	-1.01	0.86	0.25
G-protein -related	SGN-U220993	-1.01	0.73	-0.08
subtilisin-like proteinase , pathogenesis-related	SGN-U214663	-1.01	0.93	0.70
protein phosphatase 2C (PP2C), putative	SGN-U225548	-1.03	0.89	0.42
enoyl-CoA hydratase/isomerase family	SGN-U217048	-1.03	0.77	-0.02
glutathione S-transferase (Pathogenesis-related protein 1)	SGN-U212747	-1.04	0.85	0.23
bZIP transcription factor	SGN-U214344	-1.05	0.87	0.34
chaperonin 60 beta chain precursor, chloroplast	SGN-U212790	-1.05	0.81	0.14
DnaJ protein homolog	SGN-U217905	-1.06	0.91	0.57
transcription factor BTF3	SGN-U213318	-1.06	0.81	0.03
protein phosphatase 2C (PP2C), putative	SGN-U219996	-1.07	0.76	-0.02
Pathogenesis-related leaf protein 6 precursor (P6)	SGN-U212922	-1.07	1.01	0.45
bZIP transcription factor	SGN-U214344	-1.07	0.80	0.00
flavin-containing monooxygenase (FMO) family	SGN-U227713	-1.07	0.76	-0.29
heat shock protein, HSP100/ClpB, putative	SGN-U214776	-1.07	0.73	-0.16

glycyl tRNA synthetase	SGN-U218214	-1.08	0.74	-0.32
dihydrolipoamide S-acetyltransferase	SGN-U215999	-1.09	0.87	0.27
aldehyde dehydrogenase, putative (ALDH)	SGN-U230361	-1.09	0.82	-0.02
calcium-binding protein (clone Y8)	SGN-U213630	-1.10	0.85	-0.23
ubiquitin conjugating protein	SGN-U212891	-1.10	0.80	-0.13
F-box protein family	SGN-U220748	-1.11	0.77	-0.21
thioredoxin peroxidase 1	SGN-U214598	-1.12	0.96	0.43
ACC oxidase 1	SGN-U212786	-1.13	0.83	-0.35
ATP-AMP transphosphorylase	SGN-U214214	-1.13	0.81	-0.12
cycloartenol synthase	SGN-U223714	-1.14	0.82	-0.18
Pathogenesis-related protein STH-2	SGN-U212990	-1.14	0.92	0.21
RNA-binding protein RZ-1	SGN-U227474	-1.14	0.84	-0.01
DnaJ protein homolog	SGN-U220490	-1.15	1.21	1.34
secretory peroxidase	SGN-U212734	-1.15	1.21	1.25
farnesyltransferase alpha subunit	SGN-U220468	-1.16	0.90	0.13
MADS-box protein 15	SGN-U215264	-1.17	1.09	0.48
No apical meristem (NAM) protein family	SGN-U216213	-1.20	0.57	-1.28
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.20	1.01	0.38
SSXT protein family	SGN-U218846	-1.21	0.85	-0.08
peroxidase	SGN-U213352	-1.21	0.97	0.35
nucleoside diphosphate kinase 3 (ndpk3)	SGN-U214173	-1.22	1.02	0.41
Endochitinase 3 precursor	SGN-U212884	-1.22	1.06	0.38
exportin1 (XPO1)	SGN-U220216	-1.23	0.98	0.29
Protein disulfide isomerase precursor (PDI)	SGN-U212894	-1.23	0.91	-0.18
Basic 30 kDa endochitinase precursor	SGN-U212883	-1.24	1.14	0.61
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.25	1.20	0.89
bell-like homeodomain protein 3	SGN-U217306	-1.25	0.90	0.03
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.27	1.17	0.67
aldehyde dehydrogenase (NAD)	SGN-U218823	-1.27	0.86	-0.20
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.28	1.22	0.93
RNA-directed RNA polymerase (EC 2.7.7.48)	SGN-U217771	-1.28	0.95	0.08
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.28	1.14	0.55
thioredoxin peroxidase 1	SGN-U214598	-1.29	1.09	0.44
replication control protein	SGN-U222424	-1.31	0.96	0.08
AdoMet synthetase 3	SGN-U212955	-1.31	1.02	-0.11
Pathogenesis-related protein P2 precursor	SGN-U214985	-1.32	1.55	2.11
glucose-6-phosphate/phosphate-translocator precursor	SGN-U217353	-1.33	1.02	0.24
ACC oxidase 1	SGN-U212786	-1.34	0.97	-0.20
Pti5, pathogenesis-related transcriptional activator	SGN-U217388	-1.34	1.16	0.56
ACC oxidase 1	SGN-U212787	-1.34	0.84	-0.69
UMP pyrophosphorylase	SGN-U218415	-1.36	1.08	0.16
ACC oxidase 1	SGN-U212786	-1.36	0.96	-0.59
TDR4 transcription factor	SGN-U213659	-1.36	1.04	0.11
Pathogenesis-related protein P2 precursor	SGN-U233094	-1.37	1.67	2.39
beta glucanase, 1,3-beta-glucanase	SGN-U214527	-1.37	1.21	0.53
polyprotein	SGN-U214577	-1.37	1.26	1.03
serine carboxypeptidase -related	SGN-U230800	-1.38	1.06	0.14
bHLH protein	SGN-U215326	-1.39	1.13	0.11
hydrolase, alpha/beta fold family	SGN-U227863	-1.40	1.18	0.72
peptidyl-prolyl cis/trans isomerase, Pin1-type	SGN-U215175	-1.40	1.14	0.50
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.41	1.33	0.90
Basic 30 kDa endochitinase precursor	SGN-U212883	-1.43	1.30	0.77
cellulase, glycosyl hydrolase family 5	SGN-U217111	-1.43	1.19	0.21
thaumatin homolog NP24 precursor	SGN-U232219	-1.45	1.36	0.85
ethylene-responsive transcriptional coactivator	SGN-U217359	-1.45	1.35	1.38
pathogenesis-related protein PR-1 precursor	SGN-U213451	-1.46	2.07	3.80
ACC oxidase 1	SGN-U212786	-1.47	0.89	-0.98
copper chaperone (CCH)-related	SGN-U219461	-1.48	1.48	1.22
calcium-binding EF-hand family protein	SGN-U220523	-1.52	1.26	0.47
actin-related protein	SGN-U217537	-1.52	1.23	0.09
nucleoid DNA binding protein, chloroplast	SGN-U225351	-1.53	1.21	0.38
wound-inducible carboxypeptidase	SGN-U214490	-1.56	1.49	1.63
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.59	1.44	0.72
Pathogenesis-related leaf protein 6 precursor (P6)	SGN-U212922	-1.60	1.39	0.53
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.61	1.41	0.70
glucosyltransferase	SGN-U227765	-1.62	1.45	0.74
MADS-box transcription factor MADS-RIN	SGN-U212614	-1.64	1.17	-0.35
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.66	1.45	0.75
LeAux, auxin-regulated protein homolog	SGN-U215090	-1.67	1.58	1.52



floral homeotic protein APETALA2	SGN-U213383	-1.67	1.23	-0.20
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.68	1.47	0.77
casein kinase I, putative	SGN-U217559	-1.69	1.17	-0.20
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.70	1.48	0.78
cytochrome P450 family	SGN-U223227	-1.73	1.38	0.16
cell division control protein	SGN-U221518	-1.74	1.30	0.19
flavonol synthase family	SGN-U215281	-1.75	1.47	0.45
PGPD14 protein (pollen germination related protein)	SGN-U213360	-1.81	1.43	0.31
peroxidase	SGN-U215385	-1.83	1.81	1.38
ascorbate oxidase promoter-binding protein AOBP	SGN-U218715	-1.93	1.64	0.69
SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN 1	SGN-U215926	-1.95	1.54	0.00
peptidyl-prolyl cis/trans isomerase, Pin1-type	SGN-U215175	-2.04	1.78	0.97
Gibberellin 2-oxidase	SGN-U214289	-2.05	1.33	-1.00
ACC oxidase 1	SGN-U212786	-2.10	1.37	-1.02

Tabla TS7. Metabolitos con cambios significativos en pericarpio de tomate en fase Verde Maduro (MG) en frutos inducidos por GA<sub>3</sub> (G) y frutos inducidos por auxina (D), ordenados según el valor de la 1ª Componente (PCA). Los valores de concentración están en forma logarítmica y representan la media de tres réplicas frente al pericarpio en fruto fertilizado (P).

Metabolito	PCA	G (MG)	D (MG)
threonine	0.56	-0.27	0.39
glycine	0.46	-0.12	0.66
hydroxylamine	0.45	-0.37	-0.26
glucose	0.44	-0.31	-0.10
asparagine	-1.34	1.61	2.11
cysteine	-1.35	1.59	2.00
maltose	-1.65	1.25	-0.06
mannose	-1.90	1.74	1.06
fumarate	-2.09	1.88	1.05
glutamate	-2.59	3.09	4.15
inositol-1-P	<-5	5.91	0.00
fructose-6-P	<-5	5.91	0.29
glucose-6-P	<-5	7.86	0.14

Tabla TS8. Genes de expresión significativa en pericarpio de tomate en fase Rojo Maduro (R) en frutos inducidos por GA<sub>3</sub> (G) y frutos inducidos por auxina (D), ordenados según el valor de la 1ª Componente (PCA). Los valores de expresión están en forma logarítmica y representan la media de tres réplicas respecto al pericarpio de frutos fertilizados (P).

Anotación	SGN-U	PCA	G (R)	D (R)
Polygalacturonase 2A precursor (PG-2A) (Pectinase)	SGN-U213213	3.95	-1.25	-3.36
Polygalacturonase 2A precursor (PG-2A) (Pectinase)	SGN-U213213	3.68	-1.57	-3.13
zinc finger protein	SGN-U221836	3.27	-0.95	-2.80
lipid transfer protein 2	SGN-U212736	2.77	-1.45	-2.33
Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	SGN-U212595	2.58	-0.96	-2.18
RNA-binding protein, putative	SGN-U215595	2.55	-0.47	-2.31
Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	SGN-U212595	2.55	-0.71	-2.20
proteasome inhibitor, putative	SGN-U218743	2.51	-0.76	-2.08
Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	SGN-U212595	2.47	-1.02	-2.08
Polygalacturonase 2A precursor (PG-2A) (Pectinase)	SGN-U213213	2.46	-0.66	-2.07
Polygalacturonase 2A precursor (PG-2A) (Pectinase)	SGN-U213213	2.45	-0.81	-2.20
ascorbate peroxidase, thylakoid-bound	SGN-U214170	2.42	-2.18	-2.02
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family	SGN-U213588	2.38	-1.01	-2.04
lipid transfer protein LTP1 precursor	SGN-U213641	2.37	-1.04	-1.98
cytochrome P450, putative	SGN-U217123	2.33	-0.76	-1.94
calcium-binding protein (clone Y8)	SGN-U213628	2.29	-2.56	-1.81
Myb-like protein P	SGN-U218469	2.28	-1.42	-1.82
Polygalacturonase 2A precursor (PG-2A) (Pectinase)	SGN-U213213	2.28	-0.53	-1.94
Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	SGN-U212595	2.22	-0.64	-1.91
hin1-like protein	SGN-U213159	2.20	-1.37	-1.75
glutaredoxin protein family	SGN-U221959	2.20	-0.38	-1.99
WRKY family transcription factor	SGN-U212725	2.19	-1.19	-1.86
transducin, WD-40 repeat protein family	SGN-U225831	2.17	-0.56	-1.81
Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	SGN-U212595	2.16	-0.66	-1.85
beta tubulin	SGN-U212618	2.14	-0.89	-1.86
prephenate dehydratase family	SGN-U215754	2.10	-0.04	-1.95

lipid transfer protein LTP1 precursor	SGN-U213641	2.07	-0.83	-1.82
Elicitor inducible gene product Nt-SubE80	SGN-U216350	2.07	-0.53	-1.83
NBS-LRR protein	SGN-U223477	2.06	-1.28	-1.62
UDP-glycosyltransferase family	SGN-U218248	2.05	-1.54	-1.74
syringolide-induced protein 19-1-5	SGN-U213044	2.05	-1.28	-1.75
Pathogenesis-related leaf protein 6 precursor (P6)	SGN-U212922	2.04	0.22	-1.76
MEGF6	SGN-U215187	2.03	-0.45	-1.72
syringolide-induced protein 19-1-5	SGN-U213044	2.01	-1.20	-1.70
AG-motif binding protein-5	SGN-U221678	1.94	-1.32	-1.54
Pathogenesis-related leaf protein 6 precursor (P6)	SGN-U212922	1.94	0.25	-1.70
P-rich protein Nt-SubC29	SGN-U213037	1.93	-0.64	-1.63
Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	SGN-U212595	1.86	-0.64	-1.57
thiazole biosynthetic protein, chloroplast	SGN-U212885	1.86	-0.44	-1.61
No apical meristem (NAM) protein family	SGN-U214595	1.84	0.00	-1.61
metalloprotease -related	SGN-U217546	1.83	-0.72	-1.51
endo-beta-mannanase	SGN-U213702	1.82	-0.04	-1.64
Pathogenesis-related leaf protein 6 precursor (P6)	SGN-U212922	1.80	0.09	-1.53
early light induced protein	SGN-U213894	1.80	1.31	-1.73
Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	SGN-U214486	1.73	-0.85	-1.47
Ca <sup>2+</sup> -dependent lipid-binding protein	SGN-U217387	1.71	-0.91	-1.43
enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolyase) -related	SGN-U217611	1.70	-0.80	-1.45
steroleosin	SGN-U216554	1.70	-2.45	-1.40
syringolide-induced protein 19-1-5	SGN-U213044	1.68	-1.04	-1.45
pectinesterase (pectin methylesterase) family	SGN-U213495	1.67	-0.72	-1.44
Pathogenesis-related leaf protein 6 precursor (P6)	SGN-U212922	1.66	0.28	-1.47
hin1-like protein	SGN-U213160	1.60	-0.67	-1.39
calcium ATPase	SGN-U216736	1.60	-1.17	-1.40
hypersensitive-induced response protein	SGN-U213948	1.60	-0.58	-1.36
cytochrome P450	SGN-U225488	1.59	-0.08	-1.49
WIZZ	SGN-U213244	1.59	-0.90	-1.29
boron transporter	SGN-U216363	1.58	-0.70	-1.41
isoleucyl-tRNA synthetase	SGN-U231091	1.56	-0.52	-1.33
fbp11	SGN-U217280	1.55	-0.74	-1.33
gibberellin 20-oxidase-3; 2Oox-3	SGN-U219631	1.54	-1.33	-1.24
arginine decarboxylase 1	SGN-U213123	1.52	-1.37	-1.22
Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	SGN-U212592	1.52	-0.63	-1.33
RuBisCO small subunit 3A/3C	SGN-U225539	1.52	-0.22	-1.31
serine/threonine protein kinase, putative	SGN-U215564	1.49	-0.72	-1.24
Pathogenesis-related leaf protein 4 precursor (P4)	SGN-U212923	1.48	0.14	-1.28
syringolide-induced protein 19-1-5	SGN-U213044	1.46	-0.80	-1.28
expansin-like protein	SGN-U216141	1.43	-1.19	-1.17
Pathogenesis-related leaf protein 4 precursor (P4)	SGN-U212923	1.43	0.12	-1.22
root border cell-specific protein	SGN-U214880	1.42	-0.65	-1.31
TSI-1 protein	SGN-U212989	1.42	0.27	-1.26
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	SGN-U217119	1.38	0.34	-1.33
TMV response-related gene product	SGN-U214610	1.38	-1.28	-1.14
cellulase ((1-4)-beta-mannan endohydrolase)	SGN-U220982	1.35	0.27	-1.30
hin1-like protein	SGN-U213160	1.34	-0.42	-1.21
xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase	SGN-U213455	1.33	-0.81	-1.13
ZPT2-13	SGN-U213138	1.33	-0.88	-1.13
enoyl-ACP reductase	SGN-U215147	1.29	-0.59	-1.05
pectate lyase	SGN-U224511	1.24	0.68	-1.22
pol polyprotein	SGN-U215692	1.21	-0.26	-1.06
glycosyltransferase family 2	SGN-U214567	1.19	-1.43	-0.97
arginine decarboxylase 1	SGN-U213123	1.19	-1.14	-1.01
DNA-binding protein NtWRKY3	SGN-U215729	1.18	-1.36	-0.96
Peptide methionine sulfoxide reductase (Fruit-ripening protein E4)	SGN-U213992	1.17	0.17	-1.10
pectate lyase	SGN-U212775	1.16	0.79	-1.13
Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 194	SGN-U225818	1.15	-1.00	-0.92
tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	SGN-U217938	1.14	-0.91	-0.96
Myb-like protein P	SGN-U218469	1.14	-0.86	-0.94
syringolide-induced protein 19-1-5	SGN-U213043	1.14	-0.52	-1.01
ZF-HD homeobox protein	SGN-U216545	1.11	-0.24	-1.02
metalloprotease -related	SGN-U217546	1.10	-0.33	-0.98
Pectinesterase 3 precursor (Pectin methylesterase 3) (PE 3)	SGN-U216389	1.09	-0.67	-0.93
Chlorophyll A-B binding protein 1B (LHCII type I CAB-1B)	SGN-U218904	1.09	-1.24	-0.98
orcinol O-methyltransferase	SGN-U220515	1.08	-0.48	-0.92
glycolate oxidase -related	SGN-U213050	1.06	-1.10	-0.81
proline-rich protein-related	SGN-U217499	1.05	-0.25	-0.97

SERINE HYDROXYMETHYLTRANSFERASE	SGN-U215572	1.05	0.26	-1.04
xylan endohydrolase isoenzyme F9K23.10	SGN-U223905	1.03	-0.58	-0.89
cytochrome P450 family	SGN-U213423	1.03	-0.51	-0.88
acyltransferase 2	SGN-U212578	1.02	-0.37	-0.94
ACC oxidase 1	SGN-U212787	1.01	0.95	-1.00
cystatin	SGN-U213642	-1.00	0.52	0.71
CBL-interacting protein kinase 25	SGN-U214852	-1.05	0.47	0.73
ubiquitin-conjugating enzyme 16 (UBC16)	SGN-U218839	-1.05	0.86	0.69
F-box protein	SGN-U219202	-1.05	1.17	0.69
VHL binding protein; VBP like	SGN-U217276	-1.05	0.34	0.75
dormancy-associated protein -related	SGN-U213616	-1.06	-0.15	0.82
RuBisCO small subunit 3A/3C	SGN-U225521	-1.07	0.94	0.69
calcium-binding protein (clone Y8)	SGN-U213630	-1.08	1.31	0.66
expansin precursor	SGN-U213725	-1.08	0.81	0.71
glycolate oxidase -related	SGN-U212963	-1.08	2.23	0.66
nam-like protein 10	SGN-U214780	-1.09	0.62	0.78
cation exchanger, putative (CAX11)	SGN-U228639	-1.16	0.55	0.83
AP2 domain transcription factor	SGN-U220497	-1.21	0.54	0.87
glucosyltransferase twi1 (EC 2.4.1.-)	SGN-U214429	-1.21	-0.11	0.95
hydrolase, alpha/beta fold family	SGN-U214471	-1.22	0.78	0.85
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.23	0.66	0.95
transcriptional activator CBF1	SGN-U216203	-1.26	1.07	0.83
importin beta, putative	SGN-U212821	-1.27	0.48	0.93
calcineurin-like phosphoesterase family	SGN-U214941	-1.27	-0.05	0.95
wound-induced protein Sn-1, vacuolar membrane	SGN-U216966	-1.27	0.56	0.97
MYST-type acetyltransferase	SGN-U220773	-1.30	0.40	0.97
Pti5, pathogenesis-related transcriptional activator	SGN-U217388	-1.31	0.83	1.03
ethylene-responsive transcriptional coactivator	SGN-U217359	-1.31	1.79	0.92
TDR4 transcription factor	SGN-U213659	-1.33	0.76	1.04
Csf-1	SGN-U213531	-1.33	0.55	0.99
Gibberellin 2-oxidase	SGN-U214289	-1.35	2.40	0.86
dnaK-type molecular chaperone hsc70-3	SGN-U218323	-1.39	1.32	0.90
allyl alcohol dehydrogenase	SGN-U224672	-1.41	0.39	1.03
ethylene-responsive transcriptional coactivator	SGN-U217359	-1.41	1.95	1.06
arginine/serine-rich splicing factor RSp41	SGN-U217604	-1.42	0.83	0.98
cathepsin B-like cysteine proteinase	SGN-U231147	-1.42	1.27	0.95
dehydration-induced protein-related	SGN-U216299	-1.43	-0.25	1.17
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.43	0.87	1.10
calcineurin-like phosphoesterase family	SGN-U221692	-1.45	0.97	1.01
RING protein	SGN-U217504	-1.46	0.89	1.10
dehydration-induced myb-related protein Cpm7	SGN-U222613	-1.46	1.73	1.07
IAA16 protein	SGN-U218627	-1.48	0.47	1.13
DnaJ-like protein	SGN-U216888	-1.49	-0.10	1.23
late-embryogenesis protein homolog	SGN-U212930	-1.50	-0.73	1.30
F-box protein (lectin-related)	SGN-U219433	-1.51	0.17	1.15
plasma membrane H <sup>+</sup> -ATPase	SGN-U215042	-1.60	0.48	1.25
enoyl-CoA hydratase/isomerase family	SGN-U218117	-1.65	0.92	1.16
2-nitropropane dioxygenase-related protein	SGN-U217141	-1.67	0.12	1.35
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.68	1.03	1.31
oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family	SGN-U217641	-1.68	0.05	1.34
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.69	0.98	1.31
seed specific protein Bn15D17A	SGN-U214232	-1.71	1.25	1.25
nam-like protein 10	SGN-U214780	-1.72	0.83	1.26
zinc finger protein 2 (ZFP2)	SGN-U220042	-1.73	-0.32	1.43
Secologanin synthase (SLS)	SGN-U213431	-1.74	0.97	1.29
thaumatin homolog NP24 precursor	SGN-U232219	-1.74	1.02	1.35
late-embryogenesis protein homolog	SGN-U212930	-1.75	-0.44	1.49
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.76	1.06	1.38
hemolysin-related	SGN-U228261	-1.77	0.49	1.34
aldolase, plastidic NPALDP1	SGN-U212700	-1.81	0.71	1.41
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.84	1.12	1.44
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.85	1.07	1.40
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.91	1.07	1.46
flavin-containing monooxygenase (FMO) family	SGN-U227713	-1.95	0.82	1.43
late-embryogenesis protein homolog	SGN-U212930	-1.96	-0.19	1.64
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-1.96	1.04	1.53
flavin-containing monooxygenase (FMO) family	SGN-U227472	-2.04	0.86	1.50
glutathione S-transferase T3	SGN-U215328	-2.06	0.70	1.59
glutathione S-transferase	SGN-U215029	-2.12	0.74	1.62

zinc finger protein 2 (ZFP2)	SGN-U220042	-2.14	0.10	1.66
zinc finger protein 2 (ZFP2)	SGN-U220042	-2.20	-0.20	1.77
flavonoid 3',5'-hydroxylase	SGN-U223640	-2.22	2.40	1.53
Pathogenesis-related protein PR P23	SGN-U212928	-2.31	1.43	1.75
beta-carbonic anhydrase	SGN-U221044	-2.41	0.23	1.91
cellulose synthase isolog	SGN-U214840	-2.52	-0.44	2.16

Tabla TS9. Metabolitos con cambios significativos en pericarpio de tomate en fase Rojo Maduro (R) en frutos inducidos por GA<sub>3</sub> (G) y frutos inducidos por auxina (D), ordenados según el valor de la 1ª Componente (PCA). Los valores de concentración están en forma logarítmica y representan la media de tres réplicas respecto a pericarpio de frutos fertilizados (P).

Metabolito	PCA	G (R)	D (R)
malate	4.17	-2.61	-3.44
fructose	3.54	-2.26	-2.93
glucose	2.77	-2.67	-2.23
a-Ketoglutarate	2.17	-1.14	-1.85
galacturonate	2.01	-3.51	-1.50
galactose	1.57	-1.70	-1.28
gluconate	1.19	-1.87	-0.94
arabinose	1.10	-0.53	-0.98
glycerate	-1.04	1.40	0.69
pyroglutamic	-1.14	0.41	0.87
threonine	-1.19	0.76	0.89
mannose	-1.20	1.35	0.84
fumarate	-1.20	1.43	0.83
inositol	-1.38	1.78	0.95
glycine	-1.44	1.14	1.06
sucrose	-1.44	1.59	1.02
threonate	-1.52	0.61	1.18
maltose	-1.55	1.30	1.15
valine	-1.71	1.26	1.29
glutamate	-1.84	0.77	1.45
serine	-2.13	1.81	1.60
isoleucine	-2.18	1.31	1.69
cysteine	-2.30	1.74	1.76
homoserine	-2.40	1.15	1.89
aspartate	-2.58	1.35	2.03
asparagine	-2.78	1.90	2.16
proline	<-5	>8.23	>8.23
ornithine/arginine	<-5	>8.23	>8.23
fructose-6-P	<-5	>8.23	>8.23
glucose-6-P	<-5	>8.23	>8.23

Tabla TS10. Rutas que cambian significativamente en pericarpio MG de frutos inducidos por GAs (p-valor<0.05. Corrección Benjamini-Hochberg para transcritos y Bonferroni para metabolitos) respecto a pericarpio de frutos fertilizados.

	Pathway name	p value
Expresión Génica	response to xenobiotic stimulus	1.25E-05
	N-acetylglucosamine catabolic process	0.0002
	Sobrerre presenta do response to biotic stimulus	0.00206
	defense response	0.01149
	ethylene biosynthetic process	0.01458
	cell wall catabolic process	0.02831
	cellular polysaccharide catabolic process	0.04824
	Infra-represen tado plant-type cell wall organization	0.01394
	glucosinolate biosynthetic process	0.03662
	response to carbohydrate stimulus	0.03963
Metabolitos	TCA cycle	0.00205
	Sobrerre presenta do respiration (anaerobic)	0.00205
	superpathway of glycolysis and TCA variant VIII	0.00205
	superpathway of glyoxylate cycle	0.00205
	respiration (anaerobic)	0.04566
	Infra-represen tado TCA cycle	0.04566
	phospholipid biosynthesis I	0.04566
	triacylglycerol degradation	0.04566
glycerol degradation I	0.04566	

Tabla TS11. Rutas que cambian significativamente en pericarpo R de frutos inducidos por GAs (p-valor < 0.05. Corrección Benjamini-Hochberg para transcritos y Bonferroni para metabolitos) respecto a pericarpo de frutos fertilizados.

		Pathway name	p value
Expresión Génica	Sobrerrepresentado	hormone metabolism	0.025456
		hormone metabolism.ethylene	0.025456
	Infra-representado	abscission	1.43E-07
		pectin catabolic process	4.00E-05
		response to mechanical stimulus	9.56E-05
		cell wall organization	0.00024
		polysaccharide metabolic process	0.00034
		fruit dehiscence	0.00035
		response to brassinosteroid stimulus	0.00771
		response to cold	0.00897
Metabolitos	Sobrerrepresentado	No se encontraron procesos con una tendencia significativa.	
	Infra-representado	superpathway of glycolysis and TCA variant	0.00042

Tabla TS12. Rutas que cambian significativamente en pericarpo MG de frutos inducidos por auxina (p-valor < 0.05. Corrección Benjamini-Hochberg para transcritos y Bonferroni para metabolitos) respecto a pericarpo de frutos fertilizados.

		Pathway name	p value		
Expresión Génica	Sobrerrepresentado	cell wall catabolic process	9.81E-10		
		stress	2.38E-05		
		stress.biotic	1.61E-04		
		carbohydrate catabolic process	0.00057		
	Infra-representado	methionine metabolic process	8.56E-07		
		ethylene biosynthetic process	1.48E-06		
		aspartate family amino acid metabolic process	3.16E-06		
		sulfur amino acid metabolic process	7.32E-06		
		amino acid metabolic process	0.00059		
		organic acid metabolic process	0.00208		
		reproductive structure development	0.0032		
		nitrogen compound metabolic process	0.00359		
		cell wall modification	0.00386		
		developmental process	0.0058		
		regulation of carbohydrate biosynthetic process	0.00806		
		phloem or xylem histogenesis	0.01587		
		amino acid derivative biosynthetic process	0.03223		
		Metabolitos	Sobrerrepresentado	superpathway of glycolysis and TCA variant	0.00115
				respiration (anaerobic)	0.00115
				TCA cycle	0.00115
superpathway of glyoxylate cycle	0.00115				
Infra-representado	No se encontraron procesos con una tendencia significativa.				

Tabla TS13. Rutas que cambian significativamente en pericarpo R de frutos inducidos por auxina (p-valor<0.05. Corrección Benjamini-Hochberg para transcritos y Bonferroni para metabolitos) respecto a pericarpo de frutos fertilizados.

		Pathway name	p value
Expresión Génica	Sobrerrepresentado	No se encontraron procesos con una tendencia significativa.	
	Infra-representado	cell wall organization	4.51E-07
		response to mechanical stimulus	1.34E-06
		polysaccharide metabolic process	2.31E-06
		abscission	7.70E-05
		pectin catabolic process	0.00026
		carboxylic acid metabolic process	0.0003
		response to brassinosteroid stimulus	0.00133
		dehiscence	0.00234
		fruit dehiscence	0.00234
		glucan metabolic process	0.01496
	xenobiotic metabolic process	0.01903	
amino acid metabolic process	0.024		
ripening	0.03478		
Metabolitos	Sobrerrepresentado	No se encontraron procesos con una tendencia significativa.	
	Infra-representado	superpathway of glycolysis and TCA variant VIII	0.00042

## Capítulo 2





## Capítulo 2.

### Creación de un conjunto de herramientas basadas en el sistema "multisite Gateway" para la expresión y silenciamiento ARN "hairpin" dirigidos en fruto de tomate

#### 2.1. Introducción

##### Promotores de tomate utilizados en biotecnología

Algunos ejemplos en la literatura demuestran el gran potencial biotecnológico de los frutos transgénicos para la mejora de caracteres agronómicos (Carmi et al., 2003; Ficcadenti et al., 1999), valor nutricional (Mehta et al., 2002; Muir et al., 2001), rasgos organolépticos (Davidovich-Rikanati et al., 2007), e incluso valor terapéutico (Jani et al., 2002; Ma et al., 2003; Ramirez et al., 2007; Walmsley et al., 2003). A pesar de estos casos, las herramientas disponibles para la modificación genética resultan ser bastante rudimentarias, basándose en la mayoría de los casos en unos pocos promotores de fruto bien caracterizados. Los más comúnmente utilizados tienen una respuesta fuerte a etileno, y dirigen la expresión génica durante la fase IV, como es el caso de E8 (Deikman et al., 1992), o PG (Montgomery et al., 1993; Nicholass et al., 1995), con unos pocos ejemplos de promotores que dirigen la expresión en el fruto durante la fase de división (Fase II) o la fase de expansión (Fase III) como SANT/MYB like-1 y 2A11 (Barg et al., 2005; Gillaspay et al., 1993; Van Haaren and Houck, 1991). Se han realizado sólo unos pocos análisis comparativos de los promotores disponibles para hacer biotecnología en el fruto, en los que se ha puesto de manifiesto la importancia en una buena estrategia biotecnológica, del control de la expresión del transgén tanto en el espacio (tipo de tejido) como en el tiempo (fase de desarrollo). Por ejemplo, la supresión mediante ARNi de DET1 dirigida por el promotor 2A11 (Van Haaren and Houck, 1993), dio como resultado la formación de frutos enriquecidos con antioxidantes, mientras que una aproximación similar utilizando otros promotores de respuesta a etileno (como E8), no tuvo éxito debido a la necesidad de un incremento más temprano en la expresión del gen, que era proporcionado por el promotor 2A11 (Davuluri et al., 2005). En otro ejemplo, en diferentes plantas, incluidas el tomate y berenjena (Pandolfini et al., 2002; Rotino et al., 1997), se consiguió "imitar" el pulso de auxinas producido tras la fecundación. Para ello se utilizó un promotor específico de óvulo procedente de *Anthirrinum majus* (el gen homólogo de *Deficiens H9* o *DefH9*) que dirigía la expresión del gen *iaaM* de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. El gen *iaaM* codifica una triptófano 2-monooxigenasa, que cataliza la conversión de triptófano en indolacetamida, un compuesto intermediario que en la planta es metabolizado en parte a ácido -3-indolacético (IAA), produciendo así un efecto auxina. Los niveles de transcrito producidos por *DefH9*, a pesar de su bajo nivel global, fueron suficientes para lograr incrementar significativamente los niveles de auxina y producir frutos que, excepto por la ausencia de semillas, eran muy similares a los frutos típicos de tomate. De esta forma, la especificidad del promotor evitó los efectos pleiotrópicos indeseados

que se observan cuando se expresa el gen *iaaM* con un promotor constitutivo (Sitbon et al., 1992).

Por lo tanto, un diseño experimental robusto debería incluir la prueba de diversos casetes de expresión, controlados por diferentes promotores, cada uno de los cuales debería ser activo en un nivel espacio-temporal diferente. Sin embargo, a la falta de disponibilidad de promotores hay que añadir el limitado número de construcciones que se pueden poner a prueba en la práctica debido a la barrera técnica que supone el clonaje de casetes de expresión en los vectores binarios usados para transformación de plantas.

### El sistema de clonaje Gateway

El sistema de clonaje Gateway, basado en la recombinación homóloga (Hartley et al., 2000), se ha convertido en una alternativa popular a los métodos de clonaje tradicional basados en la ligasa T4 para la construcción de casetes de expresión, debido a que es un sistema de clonaje libre de ligasa, versátil y altamente eficiente (Figura 2.1). Este sistema necesita la conversión de los tradicionales vectores binarios de plantas, en los llamados “vectores de destino” mediante la introducción los llamados “casetes Gateway” que incorporan los sitios de recombinación attR1 y attR2, así como el gen *ccd4* para la selección positiva. Una vez convertido en “vector de destino”, el vector de plantas se convierte en un receptor de cualquier fragmento de ADN flanqueado por los sitios attL1 y attL2 gracias a una reacción de recombinación de un solo paso catalizada por la enzima LR clonasa.

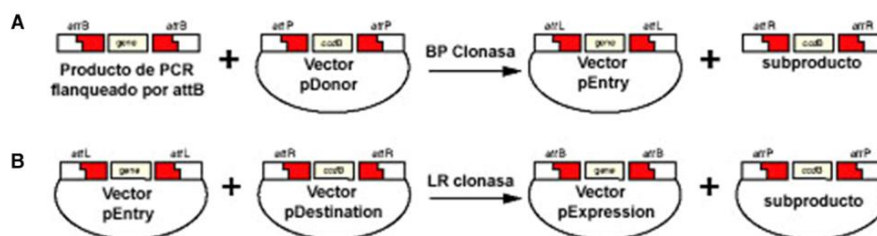


Figura 2.1. A) Reacción de recombinación BP entre un producto de PCR flanqueado por secuencias attB y un vector donante que contiene secuencias attP. El resultado es un vector de entrada (“entry” vector) y un subproducto que contiene el gen *ccdB*. B) El fragmento entre los sitios attL del “entry clone” recombina con los sitios attR en la reacción LR, dando lugar al vector de expresión.

Actualmente existen varias colecciones de vectores de destino para plantas puestos a disposición de la comunidad científica (Curtis and Grossniklaus, 2003; Curtis et al., 2003; Karimi et al., 2007; Karimi et al., 2002). Para cada colección, se han construido un número de vectores de destino a partir de un vector básico, que incorpora diferentes elementos que flanquean el casete Gateway (como elementos reguladores, genes chivato, “fusion tags”, etc.), proporcionando así una serie de herramientas “a la carta” para casi todo tipo de experimentos (análisis de promotores, estudios de localización, ensayos de sobre-expresión génica, ARNi, etc.).

El sistema Gateway multisite es una variación del sistema de clonaje descrito anteriormente (Figura 2.2).

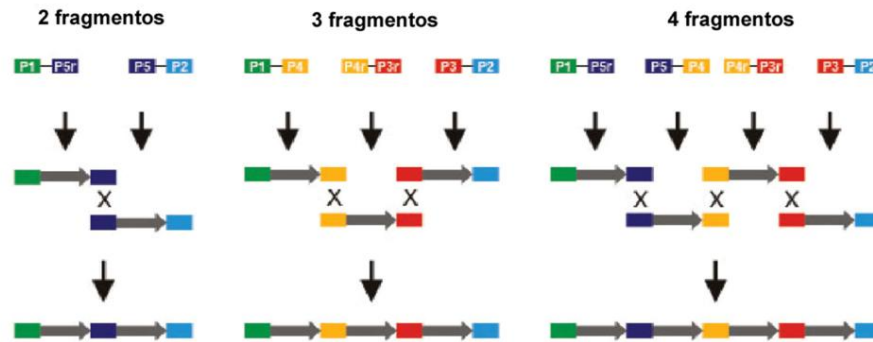


Figura 2.2. El sistema Multisite Gateway utiliza los sitios de recombinación específicos de forma que es posible la construcción de vectores de expresión en tan sólo un paso, que contendrían dos, tres o hasta cuatro fragmentos de ADN elegidos en el orden y la orientación deseados. El método está basado en el uso de seis vectores pDONR y un total de cinco sitios diferentes de recombinación específicos.

Esta variación está basada en la introducción de sitios attL y attR únicos que flanquean cada fragmento de ADN que va a ser clonado. Esta particularidad permite la introducción simultánea de hasta cuatro fragmentos dentro del vector de destino. En el sistema Gateway multisite, todos los fragmentos de ADN recombinante son incorporados "en tándem" de forma direccional mediante una sola reacción LR que se produce en un solo tubo. De esta forma, se puede construir una colección de elementos destinados a ocupar distintas posiciones dentro de esta estructura y que pueden ser combinados con un determinado gen de interés. Además, a diferencia de la primera versión del sistema "multisite Gateway", la nueva variante "multisite Gateway PRO" utiliza como vectores de destino, los vectores de plantas que contienen los casetes Gateway attL1-attL2 clásicos y que se encuentran disponibles en varias colecciones, lo que aumenta la capacidad de este sistema.

### Expresión transitoria de genes en planta

La expresión transitoria de genes en plantas implica la expresión de proteínas recombinantes sin necesidad de llevar a cabo los tediosos procesos de transformación estable y regeneración de la planta transformada. El objetivo, es el de aprovechar la capacidad infectiva de un determinado organismo para producir grandes cantidades de ARN mensajero (ARNm), que se traduce a proteínas en el citoplasma de parte de las células de la planta. Después de la traducción del ARNm a proteínas, éste es degradado por la planta y no se transmite a la descendencia. Normalmente la expresión transitoria no da rendimientos elevados y requiere un procesado rápido del tejido vegetal para evitar la degradación de la proteína recombinante.

La expresión transitoria de genes puede ser utilizada para evaluar la funcionalidad de las construcciones y producir pequeñas cantidades de producto para su análisis funcional antes de la transformación de manera estable de las plantas (Kapila et al, 1997). De todas formas, la expresión transitoria mediante agroinfiltración en hojas de tabaco puede ser utilizada para producir grandes cantidades de proteína, y podría dar lugar a una nueva plataforma de producción de proteínas recombinantes (Twyman et al., 2003).

La identificación de miles de secuencias debido a los proyectos del genoma, ha incrementado la necesidad de análisis simples y rápidos de las funciones génicas, por lo que la utilización de ensayos de expresión transitoria mediante agroinfiltración se ha incrementado como una alternativa al análisis de transformantes estables (Wroblewski et al., 2005).

Debido a los inconvenientes que presenta la transformación nuclear estable, principalmente en cuanto a tiempo, la expresión transitoria ha ido tomando mayor importancia para su utilización como sistema de producción de proteínas recombinantes (Fischer et al., 2004).

### Agroinfiltración

La agroinfiltración es una técnica que consiste en infundir mecánicamente mediante vacío, una suspensión de bacterias (*Agrobacterium tumefaciens*) en las células de la planta. Durante las primeras fases de co-cultivo, el ADN-T de cadena simple se transfiere desde la bacteria a las células de la planta (Fischer et al., 1999; Wroblewski et al., 2005), donde se convierte en una molécula de doble cadena y migra hacia el núcleo. Solamente un pequeño porcentaje se integra dentro de los cromosomas del huésped dando lugar a células transformadas de forma estable que pueden regenerarse en plantas transgénicas. El resto del ADN-T que no se integra es transcripcionalmente competente; y en este último se basan los sistemas de expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens* (Fischer et al., 1999; Orzaez et al., 2006; Voinnet et al., 2003; Wroblewski et al., 2005). De esta forma, mientras que la transformación estable mediada por *Agrobacterium* requiere vectores binarios para la manipulación tanto de *E. coli* como *Agrobacterium* y un gen marcador para detectar las plantas transformadas, en la expresión transitoria no es necesario el uso de ningún gen marcador. Esto permite el uso de vectores de expresión más pequeños y más fáciles de manejar lo que conduce a una mayor frecuencia de ligación del plásmido y transformación bacteriana. Un inconveniente de la agroinfiltración es que permite producir elevados niveles de proteína recombinante pero durante periodos de tiempo muy cortos. Este hecho se debe a que se producen fenómenos de silenciamiento post-transcripcional (PTGS) (Voinnet, 2001; Voinnet et al., 2003; Waterhouse et al., 2001).

### Agroinyección

Debido a la gran cantidad de tiempo que se necesita para producir tomates transgénicos mediante transformación estable y su posterior procesamiento, en nuestro laboratorio se desarrolló un método que permite la expresión transitoria de genes foráneos directamente en los tejidos del fruto. El método consiste en la inyección de un cultivo de *Agrobacterium* en el interior del fruto utilizando una jeringuilla con aguja. La inyección se realiza a través del ápice estilar del fruto, de forma que la solución de infiltración alcanza la superficie entera del fruto (Orzaez et al., 2006). De momento se ha ensayado en tomate debido al interés en este fruto por su amplio consumo, ser modelo de fruto carnoso y por su utilización como biofactoría para la producción de xenoproteínas de alto valor añadido como son las vacunas orales y otras proteínas

inmunoterapéuticas (Jani et al., 2002; Ma et al., 2003; Sandhu et al., 2000; Walmsley et al., 2003; Zhang et al., 2006).

Dada la escasez de herramientas biotecnológicas disponibles para el fruto, se decidió hacer uso de los datos obtenidos en los experimentos de micromatrices descritos en el capítulo 1, junto con otros extraídos de las bases de datos públicas, para aislar y caracterizar nuevas secuencias reguladoras con actividad transcripcional en fruto de tomate. Estas nuevas secuencias, junto con otras descritas por otros autores, se incorporaron a una colección de vectores en formato triple Gateway que facilitan las estrategias de clonaje en vectores binarios. La funcionalidad de los distintos elementos de esta colección se comprobó *in vivo* en fruto de tomate tanto mediante expresión transitoria por agroinyección como en transformaciones estables.

## 2.2. Materiales y Métodos

### Aislamiento de promotores y transformación de plantas

Se aisló ADN genómico de plántulas de tomate de siete días y se digirió durante toda la noche con cada una de las enzimas de restricción EcoRV, Dral, PvuII y SspI, por separado. Se ligaron adaptadores a este ADN fragmentado utilizando el GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech) y las instrucciones del fabricante. Las regiones promotoras de los genes candidatos elegidos fueron amplificadas mediante una reacción de PCR doble-anidada utilizando secuencias de unión específicas (AP1, AP2) y oligonucleótidos específicos de cada gen (GSP1n, GSP2n). La totalidad de los oligonucleótidos GSP2n fueron diseñados a partir de la secuencia situada lo más aguas abajo posible dentro de la zona 5'-UTR y considerando las restricciones de Tm, excepto para el caso de la secuencia PHD (unigen SGN-U143318) cuyo GSP2 fue diseñado a partir de la región final 5' de la región 5'-UTR de 457 pb. En el Anexo II (Tabla TS1) se proporciona una lista de oligonucleótidos específicos para gen GSP. Los fragmentos de ADN resultantes de la PCR doble-anidada se resolvieron en geles de agarosa. Aquellos con un tamaño superior a 0.6 Kb se extrajeron y se clonaron dentro del vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) y se confirmaron por secuenciación. Se consideraron clones positivos *bona fidae* aquellos cuya secuencia próxima a la secuencia del oligo GSP coincidía con la secuencia 5'UTR del correspondiente gen, siendo por tanto extensiones aguas arriba del mismo. El promotor 35S se aisló del plásmido PBI121, mientras que los promotores E8 y 2A11 se amplificaron a partir de ADN genómico de tomate. A los promotores PNH, PSN, PFF y 2A11 se les añadieron las extensiones attB1 y attB2 mediante una corta amplificación por PCR en la que se utilizó una polimerasa con prueba de lectura y fueron clonados mediante una reacción BP en el vector pDONR221 (Figura 2.3A). Para el resto de clones (PLE, PLI, y PHD, 35S y E8) la reacción BP resultó ineficiente de forma que se optó por un clonaje directo dentro del vector pENTR™ Directional TOPO (Invitrogen) como estrategia alternativa.

Los clones ENTRY resultantes se confirmaron mediante análisis de restricción y secuenciación de las regiones de unión vector-inserto y posteriormente se clonaron aguas arriba de una fusión traduccional GFP/GUS mediante una reacción LR y utilizando pKGWFS7,0 (Plant Systems Biology, Gante) como vector de destino (Figura 2.3B). Los plásmidos se transfirieron a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 por electroporación y se utilizaron en la transformación estable de plantas de tomate (var. MoneyMaker) como ya está descrito (Ellul et al., 2003).

### Análisis transitorio de los promotores

Las construcciones de expresión se transfirieron a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58 y se realizaron ensayos de expresión transitoria en frutos como se ha descrito (Orzaez et al., 2006), con una variación consistente en infiltrar los cultivos de bacterias a una densidad óptica

(OD) de 0.05. Los cultivos de bacterias se crecieron durante toda la noche y se diluyeron en medio de infiltración hasta alcanzar la densidad óptica (OD) anteriormente citada. Todos los cultivos que contenían la construcción GFP/GUS bajo distintos promotores se mezclaron 1:9 (vol:vol) con otra cepa de *Agrobacterium* que contenía la construcción 35S:DsRED (OD del cultivo = 0.05), que se utilizó como estándar interno. Las mezclas fueron infiltradas mediante una jeringa al interior de tomates en fase verde maduro (var. Microtom) como ya se ha descrito (Orzaez et al. 2006). Los tomates fueron recogidos entre cuatro y seis días después de la infiltración y separados en dos grupos (verde o en fase "breaker") dependiendo de su estadio de desarrollo. Se escanearon cortes de tomate con un escáner de fluorescencia (Typhoon TRIO Variable Mode Imager, Amersham Biosciences) utilizando una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) de 532 nm y filtros de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 610 nm para detectar dsRed, y una  $\lambda_{ex}$  de 488 nm y un filtro de  $\lambda_{em}$  520 nm para la detección de GFP realizada de manera simultánea en un segundo canal de detección. Para cada corte de tomate, se seleccionaron cuatro áreas circulares de 10 píxeles de radio cada una, situadas en la zona de la placenta y/o gel que mostraron fluorescencia DsRed, y a continuación se calcularon los ratios de intensidad de fluorescencia entre los canales verde (GFP) y rojo (DsRed). Como mínimo, se analizaron seis cortes de cuatro tomates diferentes por construcción. Para representar estos resultados los valores de ruido de fondo, calculados como la media de los ratios verde/rojo de cortes de tomates agroinyectados solamente con 35S:DsRED se restaron a los valores finales.

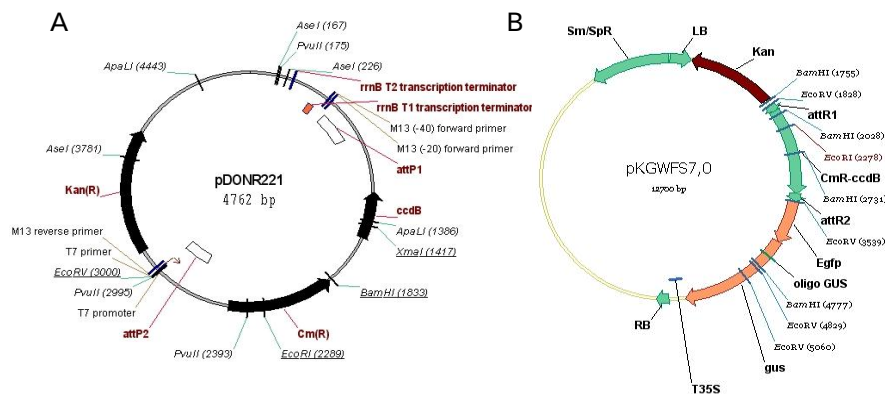


Figura 2.3. Vectores utilizados en las reacciones BP y LR del sistema Gateway. A) pDONR221 (Invitrogen) contiene los sitios de recombinación attP flanqueando por una parte un "casete" que contiene el gen ccdB y el gen de resistencia a Cloranfenicol que son eliminados como subproducto de la reacción de recombinación catalizada por la Clonasa II. Por otra parte el gen de resistencia a Kanamicina permite la selección de los clones positivos. B) vector pKGWFS7,0 (Plant Systems Biology, Gante) contiene el casete Gateway con los sitios de recombinación attR y aguas arriba de las secuencias fusionadas GFP y GUS. El gen de resistencia a kanamicina permite la selección de semillas transformadas, mientras que el gen de resistencia a espectinomicina permite la selección de los clones positivos en bacterias.

### Construcciones de plásmidos Multisite Pro

Para la construcción del kit multisite PRO, todos los fragmentos correspondientes a los promotores clonados en pCR 2.1-TOPO, fueron re-amplificados con oligonucleótidos que contenían los sitios de recombinación attB1/attB4 (ver Anexo II), y fueron incorporados dentro del vector pDONRP1-P4 mediante la reacción de recombinación BP. El promotor SAG12 fue

aislado a partir de ADN genómico utilizando oligonucleótidos específicos, y los promotores DefH9 y INO, proporcionados por el Dr. A. Dandekar (UC Davis) fueron incorporados también dentro del vector pDONRP1-P4 mediante amplificación PCR a partir de los clones suministrados. Paralelamente las secuencias deladoras YFP, la fusión GFP/GUS y dsRed fueron amplificadas con oligonucleótidos que incorporaban las extensiones *attB4R* y *attB3R*. Finalmente, el terminador de la nopalina sintasa (Tnos), los fragmentos 6xHis-Tnos y GFP-Tnos, fueron amplificados a partir de los plásmidos pMDC111 (Curtis and Grossniklaus, 2003) y pKGWFS7,0 (Plant Systems Biology, Gante) correspondientes utilizando las extensiones *attB3* y *attB2* y fueron clonados dentro del vector pDONRP3P2 mediante una reacción BP. Como resultado, se generaron tres subcolecciones de vectores de entrada: (a) pEF1-Prom-4 que contiene regiones promotoras; (b) pEF4R-GEN-3R que contiene genes deladores; y (c) pEF3-TER-2 que contiene secuencias de marcaje 3' y terminadores. La recombinación triple se comprobó generando construcciones con los clones seleccionados de pEF1-Prom-4, en combinación con pEF4R-GFP/GUS-3R y pEF3-TNos-2 mediante incubación durante toda la noche. Se siguió el protocolo de Invitrogen para la reacción LR catalizada por la LR clonasa (LR clonase II), y como vector de destino se utilizó el plásmido binario pKGW,0 (Plant Systems Biology, Gante) (Figura 2.4). Los clones positivos fueron seleccionados en placas de Espectinomicina, y se confirmaron mediante análisis de restricción y por secuenciación de las regiones de unión fragmento insertado::plásmido.

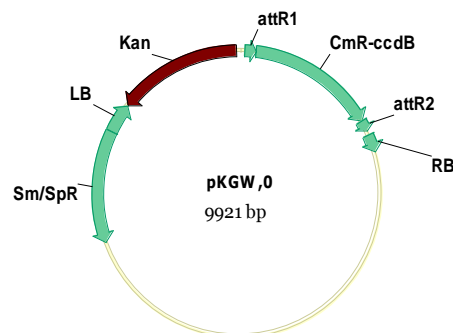


Figura 2.4. El vector pKGW,0 (Plant Systems Biology, Gante) al igual que pKGWFS7,0, contiene en su casete Gateway los sitios de recombinación *attR1* y *attR2*, pero la falta de otros componentes adicionales hicieron de este vector, el vector de destino (vector pDestination) idóneo para la construcción de plásmidos Multisite Pro por recombinación de tres vectores pEntry.

### Construcción de vectores para estrategias de silenciamiento dirigido ARNi "hairpin"

Para la construcción de los vectores pEFS y su utilización en estrategia ARNi<sub>hp</sub>, se amplificaron por separado las dos mitades de un intrón de tomate (SGN-U324070) utilizando oligonucleótidos específicos que incorporaban los sitios *attB* correspondientes, además de las extensiones "polylinker" Xho/Smal/SacI (ver Anexo II. Tabla TS1). El segmento 5' del intrón fue clonado mediante una reacción BP en el vector pDNOR4r-3r (Invitrogen) generando el plásmido pEFS4r-3r. El segmento 3' del intrón se recombinó mediante una reacción BP con el vector pDONR3-2 (Invitrogen) generando el plásmido pEFS3-2 para las construcciones destinadas a ensayos ARNi<sub>hp</sub>.



Con la finalidad de construir un vector de destino adecuado para nuestra estrategia de silenciamiento por ARNihp, el vector pK7WG2D se digirió durante toda la noche con el enzima de restricción SpeI (Plant Systems Biology, Gante). Al día siguiente se realizó una electroforesis para extraer un fragmento de 10327 pb correspondiente al vector linearizado sin el promotor 35S (2467 pb). El fragmento se purificó (Gel extraction Kit, Qiagen) y se inactivó la enzima de restricción mediante incubación a 65 °C durante 20 minutos. Finalmente se realizó una reacción de ligación (T4 ligase, Invitrogen) durante toda la noche a 16 °C y se procedió a la transformación de *E. coli* cepa DB3.1. Los clones positivos se aislaron después de un análisis de restricción utilizando el enzima SpeI.

### Ensayos de detección de actividad glucuronidasa

La detección histoquímica de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) se realizó sobre secciones de frutos de plantas de tomate transformadas de forma estable, como se ha descrito (Jefferson, 1987), con la modificación de incluir un paso de fijación de las muestras (20 minutos en hielo en acetona al 90%), previo a la detección enzimática. Para cuantificación de la actividad GUS, se introdujeron por triplicado muestras de 100 mg procedentes de diferentes órganos en placas de 96 pocillos. A no ser que se indique lo contrario, las muestras de frutos correspondientes a los estadíos de verde maduro a rojo corresponden exclusivamente a secciones del pericarpio del fruto. Estas placas con las muestras fueron congeladas y guardadas a -80°C, previas a su liofilización. Posteriormente, el tejido liofilizado de estas placas fue pulverizado mediante la introducción de cuentas de vidrio y agitación 2 veces de 3 minutos a una frecuencia de 25/s en un homogeneizador apropiado para placas (Retsch Vibration Mill Type MM 300, Qiagen). A continuación se añadieron 600  $\mu$ l de tampón de extracción GUS a cada pocillo y las placas se pusieron en agitación a una frecuencia de 25/s. Posteriormente, las placas se centrifugaron 1 hora a 4.000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue recogido y utilizado para el ensayo cuantitativo de la actividad GUS (Jefferson, 1987) y la cuantificación del contenido de proteína total, utilizando un espectrofluorímetro de placas de 96 pocillos (GENios Pro™ Microtiter). Las placas escaneadas fueron posteriormente analizadas mediante el programa XFLUOR™, TECAN.

Las secuencias promotoras están depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso de FJ586227 a FJ586232. La colección de vectores pENTRY está depositada en el repositorio Addgene con los números de acceso de 20083 a 20107.

### 2.3. Resultados

#### Aislamiento de nuevos promotores de fruto

Con el propósito de seleccionar genes candidatos para el clonaje de promotores, se llevaron a cabo varias búsquedas en bases de datos digitales, así como en sets de datos propios, resultado de análisis de expresión génica con micromatrices. De las bases de datos digitales se seleccionaron candidatos de entre aquellos “contigs” teóricos cuya abundancia relativa en genotecas de fruto era al menos cinco veces más alta que en el resto de genotecas correspondientes a otros tejidos representados en la base de datos, independientemente del estadio de desarrollo del fruto en el que el ADNc aparecía sobrerrepresentado. Para la selección a partir de análisis de micromatrices, se compararon sets de datos de plántulas, raíz, hojas y fruto en cinco estadios de desarrollo diferentes, y aquellos “spots” que mostraron expresión específica en algún estadio de desarrollo ( $r > 3$  en la comparación con tejidos vegetativos) fueron pre-seleccionados como candidatos. Se observó que los candidatos que mostraban mayor especificidad de fruto eran aquellos con niveles de expresión más altos, durante los estadios de maduración. Dado que la mayoría de los promotores disponibles actualmente son de este tipo, se decidió enriquecer el listado de candidatos con aquellos genes activos durante las fases tempranas del desarrollo del fruto, aun cuando mostrasen niveles detectables de expresión en otros tejidos. Finalmente, se generó un listado corto de seis genes candidatos (ver Anexo II Tabla TS2). Tres candidatos (correspondientes a los unigenes SGN-U212902, SGN-U144410 y SGN-U143318) respondían al perfil clásico relacionado con el proceso de maduración, aunque también mostraban niveles significativos de expresión en fruto en fase de desarrollo. Los tres unigenes adicionales en cambio, (SGN-U149666, SGN-U212930 y SGN-U212704) eran abundantes en fruto en estadios de desarrollo anteriores a la maduración.

Para cada gen candidato, se siguió una estrategia de paseo génico con el objetivo de clonar las regiones reguladoras supuestamente localizadas en la región 5' aguas arriba de cada uno de ellos. Para el diseño del Gene-Specific Primer (GSP), se utilizaron secuencias de la base de datos de Solanáceas SOL (<http://solgenomics.net/>). Los GSPs se diseñaron tan cerca al inicio de traducción como fue posible considerando las restricciones de  $T_m$ , y por lo tanto se incorporaron a la región clonada posibles regiones reguladoras 5'UTR, excepto en el caso del candidato PHD, en el que el GSP fue diseñado aguas arriba de la región 5'-UTR de 400 pb de SGN-U143318. Siguiendo con esta metodología, se obtuvieron bandas de PCR (mayores de 500 pb) de todos los seis genes candidatos, que fueron clonadas y confirmadas mediante secuenciación. La Tabla 2.1 muestra información sobre los genes cuyas regiones promotoras putativas, fueron clonadas siguiendo esta estrategia. Las secuencias promotoras se han depositado en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) con las claves FJ586227–FJ586232.

Tabla 2.1. Elementos incluidos en la colección pENFRUIT de clones pENTR.

colección de promotores pEF1-4					
Nombre	Elemento	Tamaño (pb)	Objetivo	SCN-U	Distancia ATG
pEF 1-PNH-4	PNH	3675	Promotor	U212704	-8
pEF 1-PSN-4	PSN	592	Promotor	U149666	-15
pEF 1-PFF-4	PFF	3232	Promotor	U212902	-9
pEF 1-PLI-4	PLI	1293	Promotor	U144410	-55
pEF 1-PHD-4	PHD	1499	Promotor	U143318	-377
pEF 1-2A11-4	2A11	4034	Promotor	U212581	-3
pEF 1-E8-4	E8	2226	Promotor	U212804	-1
pEF 1-35S-4	CaMV35S	1049	Promotor	-	-1
pEF 1-SAG12-4	SAG12	1516	Promotor	-	-1
pEF 1-2x35S-4	2x35S	750	Promotor	-	-1
pEF 1-INO-4	INO	2175	Promotor	-	-1
pEF 1-DefH9-4	DefH9	3480	Promotor	-	-1
colección pEF4r-3r					
pEF 4r-YFP-3r	YFP	737	Gen chivato		
pEF 4r-GUS-3r	GUS	1809	Gen chivato		
pEF 4r-GFPGUS-3r	GFP-GUS	2532	Fusión reporter		
pEF 4r-DsRed-3r	DsRed	678	Gen chivato		
pEFS 4r-3r	Intron(p1)	257	Silenciamiento ARN		
colección pEF3-2					
pEF 3-Tnos-2	Tnos	250	Terminador		
pEF 3-6HTnos-2	6H-Tnos	287	Terminador + tag		
pEF 3-G6HTnos-2	GFP-6H-Tnos	1052	Terminador + 2X tag		
pEF 3-GUS-2	GUS	1809	Marcaje		
pEF 3-CFP-2	CFP	831	Marcaje		
pEF 3-YFP-2	YFP	737	Marcaje		
pEFS 3-2	Intron(p2)	245	Silenciamiento ARN		

### Caracterización de los nuevos promotores de tomate

Para obtener información sobre la actividad de los promotores clonados, éstos fueron incorporados a vectores que contenían los genes chivatos GFP y GUS fusionados traduccionalmente el uno al otro, y estas construcciones fueron probadas en plantas. El funcionamiento, así como la actividad relativa de los promotores en el fruto, se analizaron primero mediante expresión transitoria por agroinyección, una técnica que permite ensayar la expresión en placenta, gel y zona interna del pericarpio en cuestión de pocos días. Como referencia, en los análisis comparativos se utilizaron los promotores E8, 35S y 2A11, que fueron incluidos en paralelo con el resto de ensayos. Todos los frutos fueron co-agroinyectados con el plásmido pB35S:DsRed que expresaba la proteína fluorescente DsRed. La expresión de este gen delator se utilizó como estándar interno para normalizar la eficacia del ensayo. Mediante un escáner de fluorescencia se analizaron cortes de frutos agroinyectados y se utilizó la relación de fluorescencia verde/rojo como indicador de la fuerza relativa de cada promotor en el fruto (Figura 2.5A). Los promotores 35S y PNH resultaron ser los más fuertes en ensayos de expresión transitoria. La mayor parte de promotores mostraron niveles de actividad más elevada en fruto verde, a excepción de E8 y PLI, en los que los niveles fueron más altos en cortes de tomate maduro. Los promotores PSN y PHD mostraron niveles de actividad por debajo del ruido de fondo, no pudiéndose establecer sus niveles relativos mediante esta técnica (Figura 2.5B).

Con la finalidad de conseguir más información sobre los perfiles de actividad/especificidad conferidos por cada promotor, se realizaron transformaciones estables en plantas de tomate. Se obtuvieron transformantes estables de cada una de las construcciones y se llevaron al estadio de planta adulta en invernadero, al menos diez plantas TG1 independientes por construcción.

Después de unos ensayos de actividad GUS preliminares en fruto, se seleccionaron aquellas dos plantas por línea que mostraron niveles de actividad representativos de cada construcción. Para cada línea seleccionada, se realizó un análisis GUS cuantitativo en diferentes órganos para establecer el grado de especificidad de fruto. Para el análisis GUS se establecieron los siguientes puntos de desarrollo: frutos en fase II tardía (5-7 dpa), frutos en fase III temprana (12-18 dpa), pericarpo en fase III tardía (30-35 dpa), pericarpo en fase IV temprana (breaker) y pericarpo en fase IV tardía (rojo/rojo maduro) de acuerdo con Gillaspay et al., 1993. Además, se realizaron análisis de localización histoquímica para valorar la expresión espacial a nivel de tejido de cada uno de los promotores dentro del fruto.

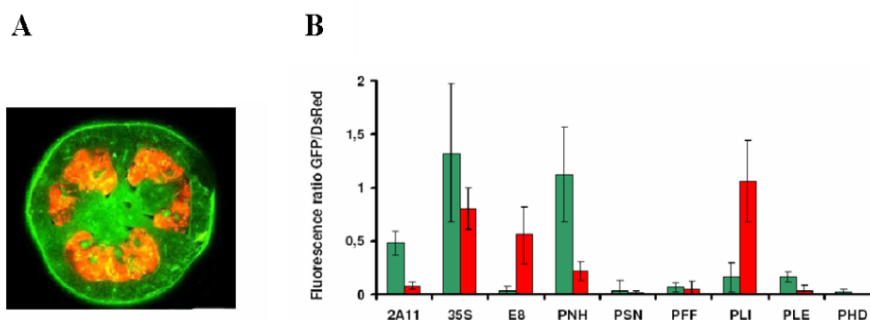


Figura 2.5. Las fusiones Promotor-GUS/GFP fueron co-agroinyectadas en frutos de *Microtom* junto con la construcción 35S:DsRed. Los cortes de los frutos agroinyectados fueron escaneados y se determinó la relación de fluorescencia Verde/Rojo. (A) Ejemplo de una imagen escaneada de un fruto agroinyectado con 35SdsRed. (B) Ratios de fluorescencia Verde/Rojo para los ocho promotores analizados de tomates agroinyectados recogidos en las fases de fruto Verde Maduro (columnas verdes) y Breaker (columnas rojas). Las barras representan la media de los ratios +/- SD.

*El promotor PNH da lugar a niveles de expresión elevados durante la fase de expansión y maduración.* La región reguladora llamada PNH se extiende 3675 pb aguas arriba del punto de traducción del unigen de tomate SGN-U212704. Su transcrito contiene una ORF de 949 pb que codifica una hipotética proteína ácida de 15 Kda sin dominios funcionales conocidos. La ORF de PNH muestra una gran homología con TUB8, un ADNc de función desconocida, cuya expresión se induce en las puntas del estolón de patata durante las fases de tuberización (Taylor et al., 1992).

PNH fue considerado como promotor candidato por poseer una elevada actividad durante la fase de expansión, de acuerdo con la abundancia relativa de SGN-U212704 en las bases de datos de expresión digitales. Los análisis cuantitativos GUS de dos plantas TG1 independientes confirmaron los perfiles de expresión esperados, con niveles cercanos a los del promotor 35S pero con un perfil más específico de fruto. PNH conduce la expresión génica en el fruto en desarrollo, alcanzando niveles máximos al final de la fase III (Figura 2.6A). Lo que quizá sea más interesante es la distribución uniforme por todos los tejidos del fruto de la actividad de este promotor, incluyendo las tres capas del pericarpo, placenta, columela y gel (ver Figura 2.7A, B). La combinación de distribución uniforme y elevados niveles de expresión, hacen que PNH sea ideal para estrategias centradas en la acumulación, a altos niveles, de algún producto como los que interesan en aproximaciones de biotecnología del fruto o "molecular farming".

La actividad del promotor PLI empieza en la parte externa del pericarpo pero avanza hacia el interior durante el proceso de maduración. Mediante paseo génico, se aisló un fragmento de ADN de 1293 pb (PLI) correspondiente a la región reguladora situada aguas arriba del unigen SGN-U144410 de tomate. SGN-U144410 codifica una proteína plastidial de 191 aminoácidos inducible por luz (ELIP), con una posible función en la transición de cloroplasto a cromoplasto (Bruno and Wetzel, 2004). La expresión de GUS dirigida por PLI durante la fase II es prácticamente nula, pero se incrementa progresivamente, alcanzando un máximo al final de la fase rojo-maduro. La región reguladora PLI dirige la expresión del gen chivato principalmente en la parte externa del pericarpo (Figura 2.7A, B) en estadios de fruto verde inmaduro. A medida que el fruto va madurando, la expresión dirigida por PLI se extiende al fruto entero alcanzando los niveles de expresión más altos en la fase de fruto rojo. En las tres líneas transgénicas analizadas se encontraron niveles bajos de expresión GUS dirigida por PLI en órganos no reproductivos (Figura 2.6A). Mediante análisis Northern, fue posible encontrar ARN mensajero de ELIP en flores (Bruno and Wetzel, 2004). Sin embargo, los ESTs de SGN-U144410 no están presentes en las genotecas de ADNc de tejido floral, aunque sí se ha encontrado en flores un buen número de ESTs de un unigen homólogo, SGN-U314409. Por lo tanto, es probable que la banda observada por Bruno y Wetzel en el análisis Northern de ELIP fuera el resultado de una hibridación cruzada con SGN-U314409.

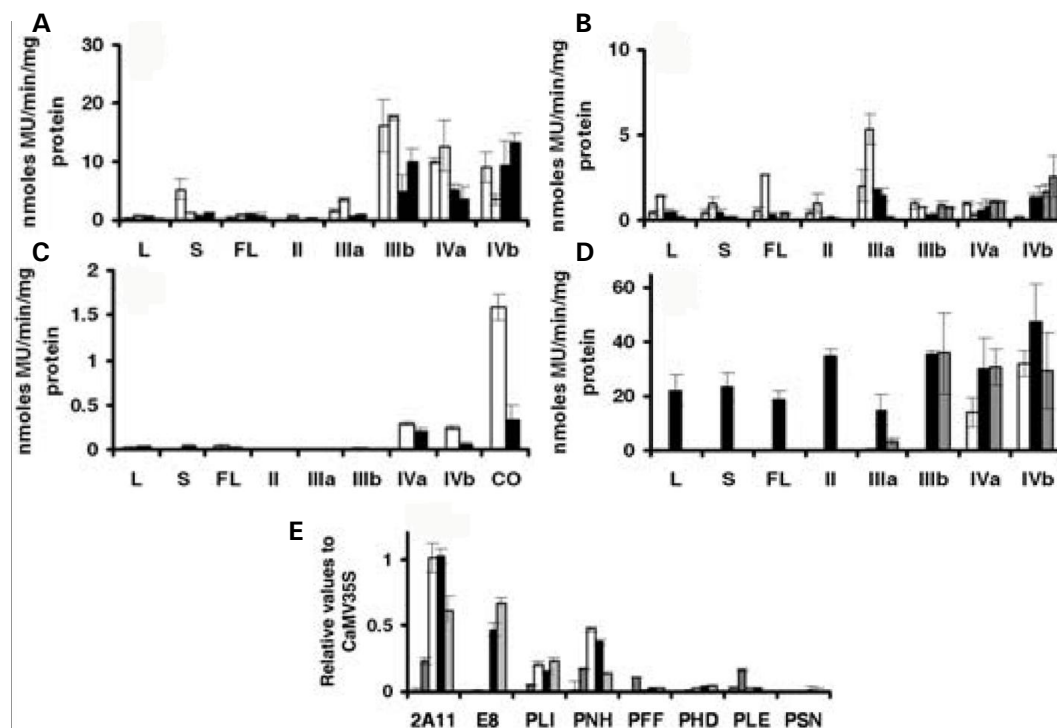


Figura 2.6. Actividad de los promotores en plantas de tomate transformadas de forma estable. Se representa, de forma cuantitativa, la actividad glucuronidasa dirigida por los nuevos promotores aislados a partir de dos plantas TG1 por construcción. Para la representación gráfica, se agruparon aquellos promotores con unos valores de actividad similares. A) Actividad de los promotores fuertes PNH (barras en blanco) y PLI (barras negras); B) promotores con actividad media: PLE (barras en blanco), PFF (barras negras) y PHD (barras grises). C) dos plantas representativas del promotor débil PSN (representadas una con barras negras y la otra con blancas), se incluye una muestra de la columela en fase de maduración (CO). D) actividades GUS de los promotores "clásicos" 35S (barras negras), E8 (barras en blanco) y 2A11 (barras grises). (L) hojas, (S) tallo, (FL) flores, (II) frutos en 5-7 días post-antesis; (IIIa) frutos en 12-18 días post-antesis; (IIIb) frutos maduros entre 30-35 dpa; (IVa) frutos en fase "breaker" (entre 35-40 dpa); (IVb) frutos rojos (entre 45-50 dpa). E) fuerza relativa a 35S en los estadios mencionados anteriormente II (barras punteadas), IIIa (gris oscuro), IIIb (barras en blanco), IVa (barras negras) y IVb (gris claro). Cada barra representa los valores medios de tres órganos por planta medidos por triplicado +/- SD.

La expresión dirigida por PFF muestra un perfil bifásico. El unigen de tomate SGN-U212902 codifica una invertasa vacuolar putativa. Las invertasas vacuolares del fruto están implicadas en las interacciones fuente/sumidero y su actividad podría estar relacionada con el control de la expansión celular mediante ósmosis. La región reguladora aquí descrita (PFF), comprende 3232 pb aguas arriba desde el inicio de traducción teórico. La expresión dirigida por PFF es baja en la fase II, incrementándose en la fase III temprana. Los niveles de GUS del pericarpo muestran unos niveles bajos de actividad en el estadio verde maduro, que aumentan durante la maduración (Figura 2.6B). Como puede observarse en la Figura 2.7A y B, el pico de expresión en la fase III temprana se localiza en la columela central. La expresión en esta área y en el resto del fruto decrece a lo largo de la expansión del fruto, alcanzando un mínimo a medida que finaliza la fase III. Posteriormente, en la fase IV, PFF vuelve a aumentar su actividad, empezando ésta en la columela central y expandiéndose gradualmente al resto del fruto. Para cuando el fruto se vuelve rojo, la expresión dirigida por PFF alcanza un segundo máximo, afectando esta vez la zona del pericarpo. Quizá el aspecto más llamativo de la expresión conferida por este promotor es su patrón espacial punteado, especialmente en el pericarpo. En este tejido, sólo una pequeña proporción de células distribuidas de forma aparentemente aleatoria a lo largo de los cortes transversales, muestra actividad GFP/GUS. Este patrón parece por tanto definir un tipo celular particular o estadio transcriptómico asociado a la actividad PFF. El estudio detallado del patrón de actividad asociado a PFF se describirá en el Capítulo 3.

Los promotores PSN y PHD son muy específicos de fruto. La secuencia de ADN llamada PSN es una nueva región aguas arriba correspondiente a la secuencia genómica del unigen SGN-U149666, procedente de unos pocos ESTs aislados exclusivamente de tejido del fruto. Este unigen contiene una ORF de 441 pb que codifica una proteína que comparte el 74% de homología con el gen Sn-1 de *Capsicum annuum*, conocido como un gen específico de fruto cuyo producto proteico se localiza en vacuolas. SGN-U149666 pertenece a la superfamilia Bet-V 1 que incluye genes relacionados con procesos de patogénesis así como alérgenos importantes. Recientemente se ha comprobado que entre los miembros de esta superfamilia se encontraría el receptor PYL5 de ABA en *Arabidopsis* (Santiago et al., 2009). Sn-1 comparte un máximo de 35.57% de identidad de secuencia con genes ortólogos de *Arabidopsis* correspondientes a esta familia génica, lo que tal vez sugiere una función de Sn-1 distinta en tomate. La región reguladora 5' aislada de SGN-U149666 se expande solamente 592 pb aguas arriba del putativo codón ATG, y confiere la especificidad más alta para la expresión en fruto detectada en nuestro análisis comparativo. No se han detectado niveles de expresión GUS en cualquier otro órgano excepto en fruto (Figura 2.6C). Dentro del fruto, la tinción GUS se localizó en la columela central, placenta y tejido vascular envolvente, y solamente en frutos en proceso de maduración (Figura 2.7A, B). Los análisis cuantitativos de actividad GUS confirmaron la expresión de X-Gluc tanto en la parte central de la columela como en los alrededores de la misma (Figura 2.6C). SGN-U149666 es un unigen poco abundante en bases de datos de expresión, en consonancia con la baja actividad GUS encontrada en las plantas transgénicas PSN:GUS. PSN constituye la región promotora más

pequeña aislada en este estudio y evidentemente no se puede descartar la falta de secuencias reguladoras aguas arriba, adicionales a las ya aisladas.

El aislamiento del promotor PHD se realizó a partir del unigen SGN-U143318, homólogo a histidina descarboxilasa (HDC). Posteriormente, este unigen ha sido reorganizado en cinco unigenes diferentes. La región reguladora clonada corresponde a SGN-U312404. De acuerdo con la base de datos de ESTs, SGN-U312404, que aparece solamente en genotecas de fruto, se expresa a niveles más bajos que el unigen principal correspondiente a la histidina descarboxilasa de tomate. En consonancia con estos datos, se observó que la región PHD aislada de 1499 pb confería niveles de expresión GUS moderados en frutos, y muy bajos en el resto de tejidos (Figura 2.6B). La expresión de GUS en el fruto alcanza todo tipo de tejidos, y es especialmente fuerte en tejido vascular (Figura 2.7A, B). Es destacable que SGN-U312404 contiene una secuencia consenso de 93 pb tipo Kozak aguas arriba del teórico ATG para la histidina descarboxilasa. Esta secuencia Kozak no se encuentra presente en el unigen HDC más abundante (debido a una simple inserción de una G), lo que sugiere para esta región un papel regulador. De esta forma, el posible uso del promotor PHD con su secuencia 5'UTR entera, incluyendo el anteriormente indicado motivo Kozak, provocaría la formación de un péptido de fusión de unos 32 aminoácidos en el extremo N-terminal de cualquier gen de interés. Es por esta razón que la secuencia 5'UTR del promotor PHD no se incluyó en nuestra construcción final.

*El promotor PLE es preferentemente activo durante la fase III.* El unigen SGN-U314285, que codifica una proteína homóloga a LEA (late embryogenesis-like protein) se utilizó como cebador para el clonaje de la región reguladora PLE de 1465 pb situada aguas arriba. Los ESTs de SGN-U314285 se encuentran en diversas genotecas de ESTs, pero su presencia es particularmente abundante en aquellas que contienen material procedente de fruto verde. Como se esperaba, las líneas transgénicas analizadas mostraron una elevada expresión de GUS dirigida por PLE en fruto verde, mostrando un máximo en la fase de expansión temprana o tardía dependiendo de la línea transgénica (Figura 2.6B, Figura 2.7A, B). El promotor PLE no mostró especificidad de fruto, encontrándose niveles elevados de expresión de GUS en flores. (Figura 2.6B).

Los promotores 35S, E8 y 2A11 se integraron en el mismo vector chivato que el resto de promotores, con la finalidad de ser utilizados como referencias en los análisis comparativos. Los tres promotores mostraron perfiles de actividad consistentes con lo publicado previamente (Deikman et al., 1992; Vanhaaren and Houck, 1993). En la Figura 2.6D se representan los niveles de actividad GUS de cada una de las líneas representativas de estas construcciones. El promotor 35S produjo la actividad GUS más elevada en este estudio en todos los estadios de desarrollo excepto en las fases de maduración "breaker" y rojo, en las que su actividad resultó comparable a la de los promotores específicos de maduración. 35S se utilizó como referencia para el análisis comparativo de la potencia de los promotores como se muestra en la Figura 2.6E. La actividad del promotor E8 (2226 pb) fue casi específica de la fase de maduración en fruto, aunque también

se observó tinción leve en tejido vascular en estadíos de desarrollo anteriores (Figura 2.7A). El promotor 2A11, que mostró un incremento agudo de actividad en el pericarpio durante la fase III tardía (Figura 2.7A), produjo bajos niveles relativos en la placenta y gel. Debido a que la expresión mediada por agroinyección ocurre principalmente en placenta y gel, esto podría explicar los bajos ratios relativos observados en la expresión transitoria de 2A11 cuando se compara con otros promotores teóricamente fuertes (ver Figura 2.5).

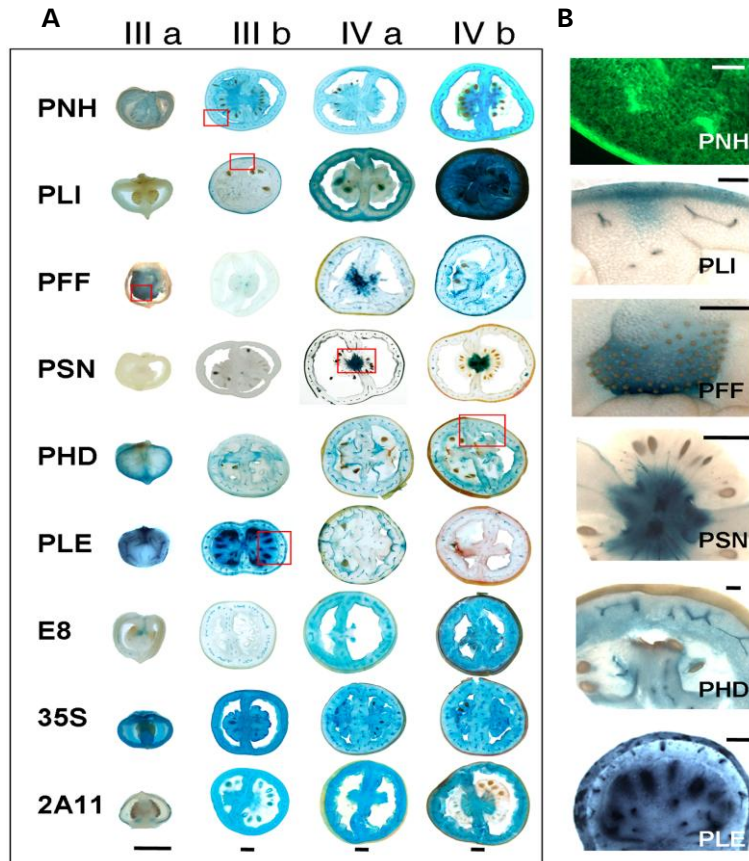


Figura 2.7. Patrones de actividad de los promotores durante el desarrollo del fruto determinados mediante el análisis histoquímico GUS. Los cortes de los frutos de las plantas transgénicas se incubaron a 37°C durante 10 minutos (PNH, E8, 35S, 2A11), 1 hora (PLI, PHD), o durante toda la noche (PFF, PSN, PLE) con sustrato de la enzima glucuronidasa. (A) Imágenes de la tinción GUS en los cuatro estadíos de desarrollo descritos en la Figura 2.6. Las barras representan 5 mm. En (B), ampliaciones de los cortes mostrando las características más representativas de los nuevos promotores aislados. Todas las ampliaciones representan tinción de GUS excepto en el caso de PNH, en el que se ilustra la distribución de la fluorescencia GFP en el pericarpio. Las barras representan 2 mm.

Un análisis exhaustivo de los nuevos promotores aislados, requiere el estudio de su actividad en estrategias basadas en genes delatores, con la finalidad de identificar genes que pudieran influir en la regulación o el control de la actividad de los promotores (Oono et al., 1998). No obstante, el análisis informático se utiliza de forma habitual para determinar regiones reguladoras en potencia, permitiendo la identificación de elementos reguladores de manera fiable (Aparicio et al., 1995). Con este propósito, las secuencias promotoras aisladas se introdujeron en la plataforma ConSite (<http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/CONSITE/consite>), una herramienta informática que permite determinar elementos reguladores en *cis* de secuencias genómicas (Sandelin et al., 2004). Los resultados revelan que algunas de las secuencias promotoras presentan elementos reguladores con una elevada similitud a los reconocidos por factores de transcripción homeóticos



en *A. thaliana* y *Antirrhinum majus*, como Athb-1 y AGL3 (*A. thaliana*), SQUA y bZIP910 (*A. majus*). La secuencia reconocida por Athb-1 parece ser la más común entre los seis promotores específicos de fruto a excepción de PFF y PSN (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Posibles elementos en cis presentes en las secuencias de los seis promotores específicos de fruto. Los resultados fueron obtenidos utilizando el programa ConSite, considerando los factores de transcripción (T.F.) de plantas y un intervalo de confianza del 95%. Signos: +: cadena sentido. -: cadena complementaria antisentido.

Promoter	T.F.	Sequence	From	To	Score	Strand
PNH	Athb-1	GAATTATT	107	114	11.367	+
	bZIP910	ACGTCAG	882	888	11.694	-
	Athb-1	AATAATTC	1018	1025	11.367	-
	SQUA	TTTACTATTTTTGG	1096	1109	15.738	-
	AGL3	CTATTTTTGG	1100	1109	14.018	-
PLI	Athb-1	CAATTATT	655	662	12.808	+
PLE	Athb-1	TAATTATT	52	59	11.619	+
	Athb-1	AATAATTG	411	418	12.808	-
	Athb-1	AATAATTA	664	671	11.619	-
	Athb-1	TAATTATT	666	673	11.619	+
	AGL3	CTATTATTGG	917	926	12.896	-
	Athb-1	AATAATTG	1030	1037	12.808	-
PFF	AGL3	CTATAAATAG	1388	1397	12.471	+
PHD	bZIP910	GTGACGT	710	716	10.348	+
	Athb-1	TAATTATT	1256	1263	11.619	+
	Athb-1	GAATTATT	1279	1286	11.367	+
PSN	bZIP910	GTGACGT	479	485	10.348	+

### Construcción de un kit de expresión basado en el sistema multisite-Gateway.

Con el objetivo de facilitar la construcción de casetes de expresión, los promotores hasta ahora descritos fueron adaptados al sistema multisite Gateway PRO. Dependiendo del tipo de sistema multisite Gateway elegido, es posible la incorporación de 2, 3 y hasta 4 fragmentos en tándem para su fusión. Con el propósito de construir casetes de expresión, se escogió la versión de tres fragmentos, que permite la incorporación de regiones promotoras como fragmento en el extremo 5' y el gen de interés como fragmento central, dejando una posición como fragmento terminal 3' para la incorporación de marcadores de la zona C-terminal, secuencias terminadoras, o una combinación de ambas (Figura 2.8).

Los seis nuevos promotores aislados descritos en el apartado anterior, fueron amplificados mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos que incorporaron las secuencias attB1 y attB4, y fueron posteriormente introducidos en el vector pDONR 1-4 por recombinación BP. Para ampliar la colección, se incorporaron a pDONR 1-4 promotores adicionales, la actividad de los cuales ya se había descrito en la literatura por su especificidad en semillas/frutos: el promotor específico de fases de desarrollo temprano del óvulo DefH9 aislado de *Antirrhinum majus* (Ficcadenti et al., 1999), el promotor específico de óvulo INO aislado de *Arabidopsis* (Meister et al., 2004) y el promotor específico de senescencia SAG12 (Swartzberg et al., 2006), (Carbonell et al, comunicación personal). La colección, llamada pENFRUIT1-4, contiene actualmente un total de trece promotores que abarcan diversos estadios de desarrollo, un amplio rango de especificidad de tejido y una amplia variación de patrón de actividad en el fruto de tomate.

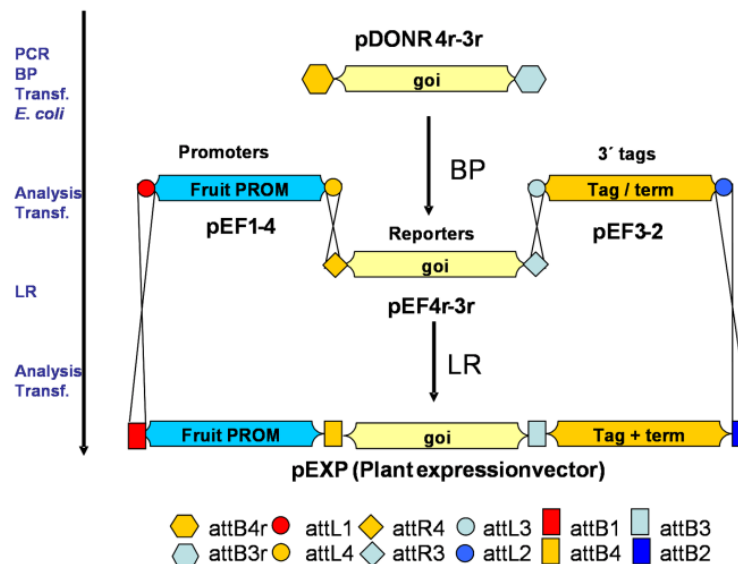


Figura 2.8. Estrategias de utilización de los elementos disponibles en nuestro sistema multisite Gateway. En una estrategia típica de clonaje y de expresión en el fruto de un gen de interés (GOI), el gen es amplificado por PCR con las extensiones *attB3r/4r* y clonado dentro del vector pDONR4r3r. El promotor de fruto es seleccionado de la colección de promotores (clonados en vectores pEF1-4), mientras que las extensiones 3' son seleccionadas a partir de la colección de vectores pEF3-2, que contiene terminadores de la transcripción y/o marcadores de proteínas. Mediante una reacción LR triple, los tres elementos son incorporados en tándem en un vector de destino de plantas que contiene los sitios *attR1-attR2*, generándose un vector de expresión. El mismo sistema puede utilizarse para el análisis de promotores que incorporen alguno de los genes chivato clonados en pEF4r-3r (GUS/GFP, GUS, YFP, DsRED). En este caso, las nuevas secuencias promotoras deberían ser clonadas en vectores pDONR 1-4 antes de la incorporación en un vector de expresión por recombinación triple Gateway.

Para facilitar el análisis de los nuevos promotores, los marcadores YFP, DsRed y una fusión GFP-GUS fueron clonados dentro del vector pDONR4-3. Por último, se incorporaron seis secuencias del extremo 3' en el vector pDONR3-2 terminal, incluyendo un terminador de la nopalina sintasa (T-nos) y varios fragmentos para el marcador del extremo C-terminal de proteínas de interés: 6XHis-Tnos, GFP-6XHis-Tnos, CFP, YFP y GUS. Mediante el uso de genes de interés específicos (GOIs), en nuestro laboratorio se ha confirmado repetidamente la fiabilidad de la reacción de recombinación triple, reacción LR del sistema Gateway, utilizando la colección actual de promotores (datos no mostrados). La Tabla 2.1 proporciona de forma resumida todos los elementos incluidos actualmente en la colección.

### Adaptación de la colección de promotores a sistemas de ARNihp

Para extender la utilización de la colección de promotores, se desarrolló una estrategia simple que nos permitió incorporar construcciones ARNihp a nuestro sistema triple Gateway. Este tipo de construcciones se utilizan con el propósito de introducir ARN en forma de horquilla (ARNhp), lo que desencadena la respuesta de silenciamiento post-transcripcional (PTGS). Este tipo de aproximaciones han resultado más eficientes en el silenciamiento génico que las basadas en las técnicas antisentido o la co-supresión (Ossowski et al., 2008; Waterhouse and Helliwell, 2003). Con este propósito, se diseñaron dos nuevos vectores de entrada, pEFS4r-3r y pEFS3-2. Ambos vectores contienen la misma región de clonaje (*polylinker*) pero en orientaciones invertidas, de

manera que los fragmentos del gen a silenciar puedan ser insertados mediante enzimas de restricción. Entre ambos sitios de clonaje, se sitúa un fragmento de un intrón de tomate eliminable mediante "splicing". La combinación de un promotor de tomate en formato pEF1-4 con los vectores pEFS en una recombinación triple Gateway, genera una construcción en horquilla o "hairpin" con el intrón formando el bucle o "loop" (Figura 2.9). Estas construcciones pueden ser utilizadas para el silenciamiento de un gen de interés (GOI) de forma específica en tejidos determinados, como el que se llevaría a cabo mediante el uso de los promotores descritos anteriormente y que aparecen en la Tabla 2.1.

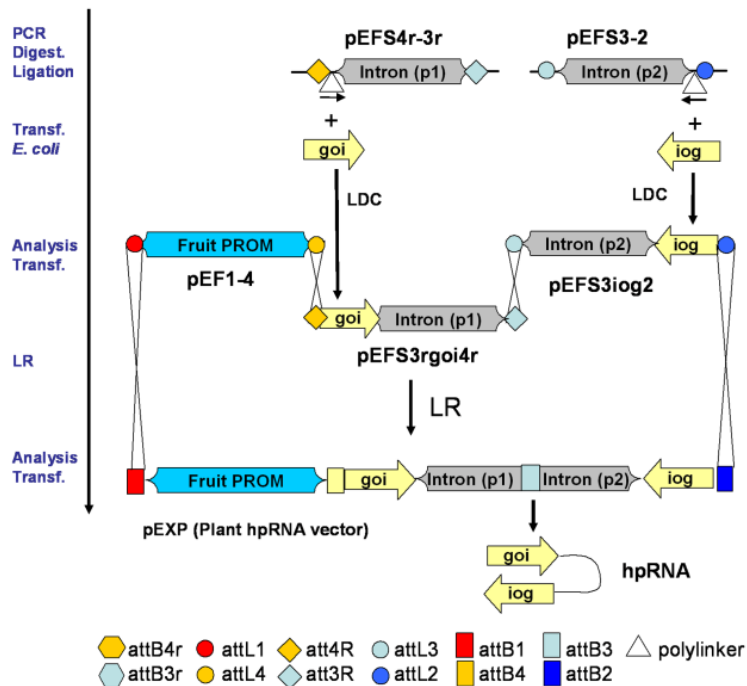


Figura 2.9. Es posible adaptar el kit de promotores de fruto a ensayos de ARNihp mediante la fabricación de dos vectores pENTR adicionales, llamados pEFS4r3r y pEFS32. Cada plásmido incorpora aproximadamente la mitad de un intrón de tomate y una pequeña zona polylinker. Esta zona polylinker contiene sitios SacI, SmaI y XhoI y se dispone en orientaciones invertidas en cada plásmido. Para estrategias ARNihp, es necesario el clonaje tanto en pEFS4r3r como en pEFS32, de un fragmento del gen de interés (GOI) usando dos de los enzimas de restricción de la zona polylinker. De esta manera el fragmento de GOI es insertado en dos orientaciones invertidas en plásmidos separados. La recombinación triple Gateway genera una construcción ARNihp dirigida por el promotor elegido por el propio usuario y que contiene un intrón de tomate que se puede procesar mediante "splicing". Como puede observarse en la figura, el sitio attB3 se localiza dentro del intrón (triángulo gris) con la finalidad de ser procesado durante la maduración del ARN.

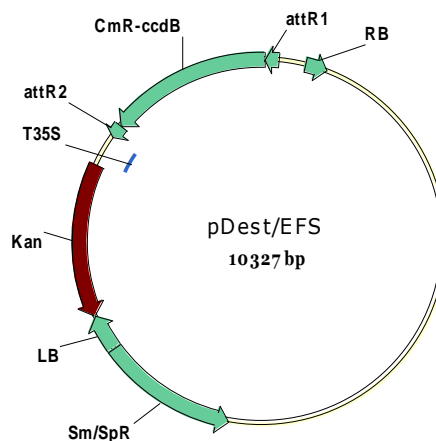


Figura 2.10. Vector de destino para estrategias de silenciamiento ARNihp dirigido, originado a partir del vector pK7WG2D y que ya contiene una secuencia terminadora 35S aguas abajo de la secuencia attR2.

El vector pK7WG2D (Plant Systems Biology, Gante) se utilizó como estructura base para la obtención del vector de destino pDest/EFS por eliminación del fragmento correspondiente al promotor 35S (ver materiales y métodos) situado aguas arriba de los sitios *attR1-attR2*. De esta manera el vector pDest/EFS resulta idóneo para una estrategia ARNi<sub>hp</sub>, ya que contiene una secuencia correspondiente al terminador del promotor 35S aguas abajo de los sitios de recombinación "Gateway" *attR1-attR2* (Figura 2.10). Esto permite la realización de construcciones para ensayos de silenciamiento dirigido por cualquiera de los promotores pEF1-4, y el uso de los vectores pEFS4r-3r y pEFS3-2 sin la necesidad de incorporar una secuencia terminadora.

## 2.4. Discusión

El uso de colecciones de plásmidos Gateway simplifica los procedimientos de clonaje y facilita el uso de estrategias de alta productividad (“high-throughput”). Hasta la fecha, las colecciones de vectores Gateway en el ámbito de las plantas estaban destinadas a objetivos generales, y estaban formadas principalmente por vectores de destino que incorporaban elementos reguladores/señalizadores constitutivos (fundamentalmente utilizados en estudios de *A. thaliana*). Respondiendo a una demanda de investigadores de Solanáceas y por extensión de otros grupos interesados especialmente en el fruto, este trabajo ha proporcionado una colección Gateway destinada específicamente a la expresión génica (y silenciamiento) en el fruto. Las nuevas técnicas de clonaje basadas en recombinación homóloga han favorecido la caracterización de nuevas secuencias reguladoras con actividad en el fruto y que contribuyen a ampliar el espectro de promotores disponibles con fines biotecnológicos (Fernandez et al., 2009). Resulta indispensable que tal aproximación proporcione un conjunto de promotores que actúen en el órgano/tejido de interés, y que en este caso está formado por dos promotores constitutivos (35S y 2X35S), dos promotores “clásicos” asociados a la maduración (E8 y 2A11), dos promotores específicos de óvulo (DefH9 e INO), un promotor específico de senescencia (SAG12), y seis nuevos promotores de fruto dirigidos a subsanar el vacío existente en el espectro de las regiones reguladoras disponibles en la actualidad, en particular durante las fases II y III del desarrollo del fruto del tomate.

Como test comparativo, los nuevos promotores junto con E8, 2A11 y 35S se probaron de manera transitoria mediante la técnica de la agroinyección y posterior evaluación de la expresión del gen delator GFP por rastreo de fluorescencia. Debido a que la expresión mediada por agroinyección no es homogénea en todos los tejidos del fruto, esta técnica solamente proporciona información de la funcionalidad y la potencia relativa del promotor en aquellos tejidos (como placenta, tejido gelificado y endocarpo) en los que se consigue una transformación transitoria eficiente. A pesar de esto, se encontró una correlación considerable en todos los promotores analizados entre los resultados obtenidos mediante transformación estable y los obtenidos mediante agroinyección. Los promotores más débiles (PHD y PSN), que mostraron una actividad GUS con niveles inferiores a 2-3 nmoles MU min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> en líneas transgénicas estables, tenían niveles inferiores a los del ruido de fondo en los ensayos de transformación transitoria. Es probable que el uso de luminiscencia en lugar de genes de señalización fluorescente pudiera incrementar la sensibilidad del método.

Aunque no se puede descartar que en los fragmentos promotores aislados aquí falten elementos reguladores aguas arriba, los estudios de actividad de los distintos promotores en fusiones transcripcionales al gen GUS realizados en plantas transgénicas estables están en concordancia con el patrón de expresión del gen original observado tanto mediante el análisis de micromatrices (Anexo II. Figura FS1), como con la información disponible en las bases de datos de ESTs (<http://ted.bti.cornell.edu/>). Un análisis más detallado en las plantas transgénicas permitió una mejor descripción del nivel de especificidad de los promotores, así como de la distribución de su

actividad a nivel tisular dentro del fruto. Muchos de los promotores aislados, a pesar de ser activos principalmente en el fruto, mostraron niveles de expresión detectables en algunos órganos vegetativos analizados en este trabajo. Esta observación está en consonancia con la tendencia observada en bases de datos digitales y análisis de micromatrices, en los que se observó una mayor especificidad en aquellos ARNm asociados con el proceso de maduración. A pesar de esto, la especificidad de promotores como PNH o PLI que mostraron una actividad diez veces mayor en fruto, debería ser suficiente para muchas de las aplicaciones que requieran un moderado grado de expresión específica de fruto. La especificidad estricta a nivel de fruto parece ser difícil de obtener, tanto es así que la actividad de promotores considerados como específicos de fruto como E8 ha sido detectada en otro tipo de tejidos (Kneissl and Deikman, 1996). De la misma manera, en este trabajo se han encontrado niveles detectables de expresión GUS dirigida por E8 en tejidos donde no se esperaba tal expresión (en tejidos vasculares de frutos inmaduros por ejemplo). Los nuevos promotores aislados contribuyen a cubrir los vacíos de expresión en los estadios de desarrollo correspondientes a las fases III y IV, lo que resulta interesante para posibles aplicaciones biotecnológicas y de estudios básicos (Figura 2.11).

Como ejemplo, PNH es un buen candidato para la expresión de moléculas recombinantes o aproximaciones de ingeniería metabólica, en las que se requiere unos niveles elevados de acumulación del producto en el fruto antes del inicio de la maduración (Davuluri et al., 2004); el patrón de PFF podría contribuir a fortalecer o alterar el status fuente-sumidero en el fruto; la actividad de PLI puede ser interesante para la biotecnología del cromoplasto; PSN podría utilizarse como elemento regulador desencadenante de procesos auto-catalíticos como la expresión de vectores de expresión virales (Cai et al., 2007), mientras que la ubicuidad de PLE puede explotarse en aproximaciones de intra-génesis en el género *Solanum* en las que fuera necesaria la expresión en fruto en fase de desarrollo (Jacobsen and Schouten, 2007).

El análisis de elementos reguladores en *cis* determinó que los promotores clonados presentaban secuencias de unión de factores de transcripción homeóticos que intervienen en diversos procesos del desarrollo como Athb-1 perteneciente a la familia HD-Zip I. Los genes HD-Zip actúan en diversos procesos del desarrollo, concretamente los niveles de transcritos de los genes HD-Zip I resultan afectados por ácido abscísico o estrés hídrico y por diferentes condiciones de luz (Henriksson et al., 2005). Algunos promotores presentan elementos reguladores de unión a factores MADS-BOX que en *A. thaliana* determinan identidad floral como SQUA (West et al., 1998) y AGL3 (Huang et al., 1995), o a elementos que se expresan preferentemente en órganos florales de *A. majus* como bZIP910 (Jaime et al., 1998). En tomate, se ha demostrado la importancia de los genes de identidad floral en la regulación del desarrollo del fruto (Ampomah-Dwamena et al., 2002; Busi et al., 2003; Wang et al., 2009), por lo que no se puede descartar una función de estos genes en la regulación de la actividad de algunos de los promotores específicos de fruto aislados, como el caso de PFF, PHD o PSN (Tabla 2.2). La realización de experimentos basados en estrategias de respuesta de genes delatores a factores que afecten la actividad de los promotores, podrían confirmar la presencia de estos elementos reguladores o de elementos reguladores adicionales.

Todos los promotores de la colección fueron incorporados dentro del sistema Multisite PRO para conseguir una mayor versatilidad. En este trabajo, se optó por un sistema Triple Gateway PRO. Esta versión puede utilizar los vectores binarios *attR1/attR2* puestos a disposición de la comunidad científica por otros autores. Así, la colección pENFRUIT es compatible con otras colecciones de vectores Gateway de plantas *attR1/2* y contribuye a ampliar sus posibilidades.

El paso que supuso una mayor dificultad en el clonaje "Gateway" fue el de generar vectores pENTR que incorporaran largas regiones promotoras abundantes en A/T. Con la generación de la colección pENFRUIT, este paso limitante se ha superado y la construcción de un vector para la expresión específica en fruto puede realizarse en unos cinco días de trabajo.

Al igual que ocurre en la expresión ectópica, las estrategias de silenciamiento por ARN requieren también una regulación precisa, ya que la reducción del ARN del gen de interés en otros estadios/localizaciones diferentes del deseado puede dar lugar a efectos pleiotrópicos que afecten a la viabilidad o rendimiento de la planta. Diferentes grupos han demostrado la posibilidad de conseguir silenciamiento génico regulado mediante la incorporación de promotores inducibles o específicos de fruto (Davuluri et al., 2005; Wang et al., 2005; Wielopolska et al., 2005). A pesar de ello, muchos plásmidos ARNi<sub>hp</sub> para la transformación de plantas están dirigidos por promotores constitutivos. La incorporación por parte de Karimi y colaboradores (Karimi et al., 2007), de vectores de destino adaptados para el sistema clásico "multisite Gateway" (distinto del "multisite Gateway PRO" que se ha desarrollado en este trabajo) ha constituido un avance importante, que facilita las estrategias reguladas por promotores. Sin embargo esta aproximación requiere de la difícil incorporación *de novo* de regiones promotoras dentro de vectores pENTR, mientras que en la colección pENFRUIT este paso ya está resuelto.

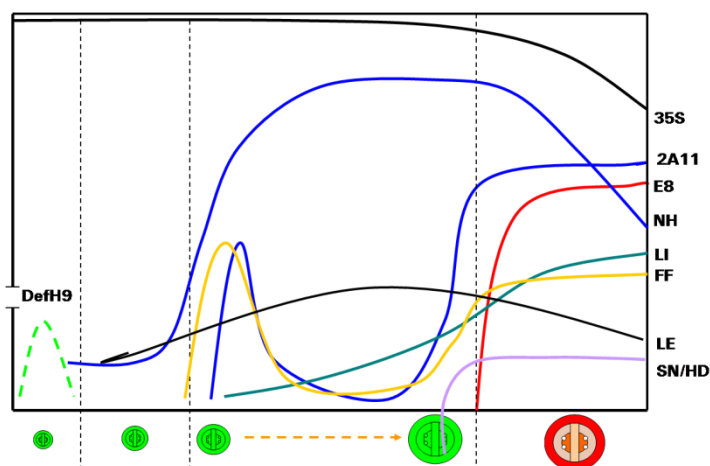


Figura 2.11. Esquema indicativo que representa el nivel de actividad de distintos promotores a lo largo del desarrollo del fruto en *S. lycopersicum*. Cortesía del Dr. Diego Orzaez.

Como complemento, parte de este trabajo se ha centrado en la adaptación de la colección pENFRUIT a estrategias ARNi<sub>hp</sub> con la adición de dos plásmidos pENTR\_ARNi a la colección y con la construcción de un nuevo vector de destino. De esta manera, la colección pENFRUIT puede abarcar

estrategias ARNi, con el solo requerimiento de un paso de clonaje tradicional con enzimas de restricción.

La combinación del clonaje tradicional y el clonaje "Gateway" expande las posibilidades de los sistemas "Gateway", como se ha demostrado recientemente (Dubin et al., 2008). Es interesante destacar, que con la incorporación de un intrón procesable de tomate, las estrategias ARNi en tomate se realizarían siendo los sitios *attB* las únicas secuencias de ADN que no serían de tomate (excluyendo las secuencias flanqueantes LB y LR). En un trabajo publicado recientemente (Fernandez et al., 2009) similar al descrito en este capítulo, se diseñan vectores para el silenciamiento dirigido mediante el uso de microARNs artificiales (amiARNs), esta técnica utiliza la información de secuencia de precursores de microARNs endógenos para el diseño de fragmentos de 21 nucleótidos de doble cadena similares a los microARNs producidos por el gen que se pretende silenciar, y en algunos casos ha resultado más eficiente que las estrategias ARNi (Ossowski et al., 2008). Aunque el uso de amiARNs se encuentra en fases iniciales en tomate debido principalmente a la falta de información de secuencia en Solanáceas, las secuencias amiARN podrían incorporarse a la colección pENFRUIT en vectores pEF4r-3r mediante una sencilla amplificación solapante que incorporaría los sitios de recombinación *attB4r* y *attB3r* en los extremos 5' y 3' respectivos de estas secuencias.

En conclusión, se han incluido en la colección trece promotores con actividad en fruto, que junto al resto de vectores incluidos en la colección permite un total de setenta y ocho combinaciones posibles para la expresión de un gen de interés en el fruto de tomate, cubriendo un rango amplio de tejidos, estadios de desarrollo y etiquetados en el extremo C-terminal. Esta colección puede utilizarse en otras especies de plantas, aunque para ello en cada caso deberían establecerse los perfiles de expresión dirigidos por cada promotor. Dada la simplicidad técnica de la recombinación triple del sistema "Gateway", ya no supone un reto el obtener diversas alternativas de expresión para uno o varios genes de interés.



**Anexo II**

Tabla TS1. Listado de oligonucleótidos utilizados en la construcción de la colección de vectores pENFRUIT.

**Oligonucleótidos utilizados en el Paseo Génico (Genome Walker)**

**AP1:** gtaatacgaactcactatagggc

**AP2:** actatagggcagcgtggt

Promotor	GSP1	GSP2
<b>PNH</b>	gcagattcaacctcaacactggccattgga	aagttgaaaataagaagatgggaaagagg
<b>PSN</b>	tcgggtgtcctccacactttacctccacta	aaagcaattaattgcctttcacacccat
<b>PFF</b>	cgggttgatccgggagtaatgtgtaacgag	gcggagtttcggggtcataaacactgagtg
<b>PLE</b>	ctgcggcggaggagtttggtatggagct	gcgaactgaaattctgtagcttcgactctc
<b>PLI</b>	aacagctaggaacaaactgattcaacccat	tgaagaagtactagtattgtatagatcgcg
<b>PHD</b>	gataagacattgagttgagtctccatgca	caaattgatgataagatgatgactgaggca

**Oligonucleótidos utilizados para la construcción de vectores pENTR1-2:**

Oligonucleótidos utilizados en el clonaje BP dentro de pDONOR221.

Promotor	DIRECTO	REVERSO
<b>PNH</b>	attB1-atcattttcaacgaaaaaggtt	attB2-aagttgaaaataagaagatggg
<b>PSN</b>	attB1-gtttaagttagctatggtgagtctcc	attB2-caataattttggaagaagatgg
<b>PFF</b>	attB1-atcaaatcggtttgctcttg	attB2-gaagatagaggaatgggagaagc
<b>2A11</b>	attB1-gtcaacaatttgaggaattcaa	attB2-tggtttggattaattgctaattga

**Oligonucleótidos utilizados en la estrategia de clonaje pENTR Directional TOPO.**

Promotor	DIRECTO	REVERSO
<b>PLE</b>	cacc-AP2	GSP2 (PLE)
<b>PLI</b>	cacc-AP2	GSP2 (PLI)
<b>PHD</b>	cacc-AP2	GSP2 (PHD)
<b>E8</b>	cacctggaattcgagctcgggtacc	tgccgaattcgggatccggtc
<b>35S</b>	caccgactagagccaagctgatctcc	gcctgcaggtcgactagaa

**Oligonucleótidos utilizados en la construcción de la colección de vectores Gateway Pro**

Nombre	Elemento	Oligo. Directo	Oligo. Reverso
pEF 1-PNH-4	PNH	attB1-atcattttcaacgaaaaggtt	attB4- aagttggaaaaaagaagatggg
pEF 1-PSN-4	PSN	attB1-gtttaagtagctatggtgagctctcc	attB4- caataattttggaaagaagatgg
pEF 1-PFF-4	PFF	attB1-atcaaatcggtttgccttg	attB4- gaagatagaggaatgggagaagc
pEF 1-PLE-4	PLE	attB1-atctttaaaaaaatattctcta	attB4- gcgaactgaaattctgtagcttcga ctctc
pEF 1-PLI-4	PLI	attB1-actatagggcagcgtggt	attB4- ggtcggcgcgccaccctt
pEF 1-PHD-4	PHD	attB1-actatagggcagcgtggt	attB4- ggtcggcgcgccaccctt
pEF 1-SAG12-4	SAG12	attB1-ggtagcaagtcgattatttgcc	attB4- gttttaggaaagttaaatgactt
pEF 1-2x35S-4	2X35S	attB1-agctcggtagccctactcca	attB4- tgggctgcctctccaatg
pEF 1-INO-4	INO promoter	attB1-cagtttacaaggtgatgg	attB4- gagagagtgtgtgtacgat
pEF 1-DefH9-4	DefH9	attB1-aattcggcagcaggtccctt	attB4- gtacctcagaaaaataacctaattc
pEF 1-2A11-4	2A11	attB1-gtcaacaattttgaggaattcaa	attB4- tggttttggattaattgctaattga
pEF 1-35S-4	35S	attB1-gactagagccaagctgatctcc	attB4- actagtgcggccgctgca
pEF 1-E8-4	E8	attB1-tggaattcgagctcggtacc	attB4- tgccgaattcggggatccggtc

Nombre	Elemento	Oligo. Directo	Oligo. Reverso
pEF 4r-YFP-3r	YFP	attB 4r-atggtgagcaagggcgagga	attB3r- gtacctagctcatgactga
pEF 4r-GUS-3r	GUS	attB 4r-atgttacgctctgtagaaac	attB3r- tcattgtttgcctcctgct
pEF 4r-GFP-GUS-3r	GFP-GUS	attB 4r-atggtgagcaagggcgagga	attB3r- tcattgtttgcctcctgct
pEF 4r-DsRed-3r	DsRed	attB 4r-atggcctcctccgaggacgt	attB3r- ctacaggaacaggtggtggc
pEFS 4r-3r	RNAi. Intron1	attB 4r- gagctccgggctcgagtacacaggtgacaat ag	attB3r- tctagagtgccacacct
pEF 3-Tnos-2	Tnos	attB3-gatcgttcaaacatttgcaat	attB2- tcagtaacatagatgacaccg
pEF 3-6HTnos-2	6H-Tnos	attB3-caccaccaccaccactaag	attB2- tcagtaacatagatgacaccg
pEF 3-G6HTnos-2	GFP-6H- Tnos	attB3-gtggtagatgcttggcgcgc	attB2- tcagtaacatagatgacaccg
pEF 3-GUS-2	GUS	attB3-atgttacgctctgtagaaac	attB2- tcattgtttgcctcctgct
pEF 3-CFP-2	CFP	attB3-gtggtagcctagggtgagcaa	attB2- agcgtaatctggaacatcgt
pEF 3-YFP-2	YFP	attB3-atggtgagcaagggcgagga	attB2- gtacctagctcatgactgac
pEFS 3-2	RNAi. Intron2	attB3-atacattcgtttgagctg	attB2- gagctccgggctcgagatgac aacctacagatca

Tabla TS2. Datos de expresión de micromatrices (TOM1) obtenidos de una hibridación directa por duplicado (con intercambio de fluoróforos o "dye swap") que se realizó entre dos mezclas, una de partes vegetativas (hojas, plántulas y raíces) y otra de frutos en las fases IIa, IVa e IVb de tres plantas de tomate independientes. Los datos están ordenados según sus valores log Ratio (fruto/partes vegetativas).

Nombre	TOM1 I.D.	SGN-U	Anotación	Log Ratio
SN	1-1-1.4.11.18	U149666	wound-induced protein Sn-1	6.363
SN	1-1-2.3.19.5	U149666	wound-induced protein Sn-1	5.835
FF	1-1-8.3.8.2	U212902	vacuolar invertase, beta-fructofuranosidase	5.792
HD	1-1-2.4.19.15	U143318	Histidine decarboxylase (HDC) (TOM92)	5.495
LI	1-1-5.1.10.14	U144410	early light induced protein	5.285
FF	1-1-2.1.17.12	U212902	vacuolar invertase, beta-fructofuranosidase	3.771
FF	1-1-5.2.12.7	U212902	vacuolar invertase, beta-fructofuranosidase	3.205
NH	1-1-1.3.2.10	U212704	No Hits	3.004
LE	1-1-8.1.20.21	U212930	late-embryogenesis protein homolog	2.662
LE	1-1-5.3.4.1	U212930	late-embryogenesis protein homolog	2.494
NH	1-1-5.4.6.8	U212704	No Hits	2.033
NH	1-1-1.1.8.12	U212704	No Hits	1.758

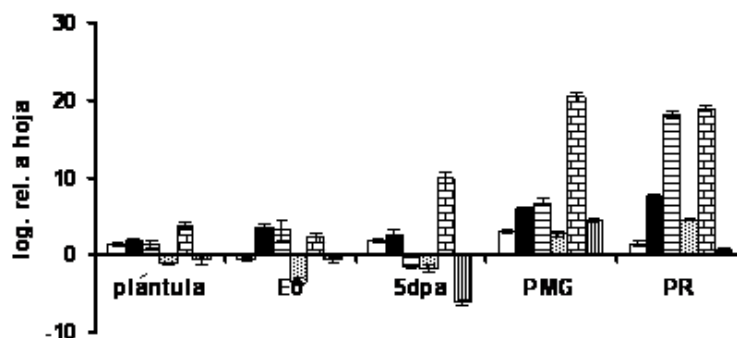


Figura FS1: Medidas de expresión génica RT-PCRq. Niveles de expresión relativos en plántulas de tomate, ovarios en fase de antesis (E0), frutos de 5-7 días post-antesis (5dpa), pericarpo de frutos Verde Maduro entre 30-35 dpa (PMG) y pericarpo de frutos rojos (entre 45-50 dpa) (PR), de los genes NH (barras blancas), LI (barras negras), HD (rayas horizontales), FF (barras punteadas), SN (ladrillos) y LE (rayas verticales). Las barras representan valores logarítmicos de ratios (fruto/hoja) de medias obtenidas de tres réplicas +/-SD.



## Capítulo 3



Capítulo 3.

Identificación y caracterización transcriptómica de un nuevo tipo celular o estadio transcriptómico, que exhibe un patrón punteado de expresión del promotor PFF en el pericarpo y cuya prevalencia aumenta con la maduración del tomate

3.1. Introducción

Transporte de sacarosa en plantas

La fijación del CO<sub>2</sub> por las plantas ocurre principalmente en las células del mesófilo de las hojas. Estos órganos son los exportadores de azúcares y son conocidos como "fuentes" de carbono. Las células de las raíces, las estructuras reproductivas, las de almacenaje y los órganos en fase de desarrollo, dependen de un aporte de azúcares para su mantenimiento y son conocidos como "sumideros" de carbono (Williams et al., 2000). La sacarosa es la forma principal de carbono reducido que es transportada a lo largo de la planta. Después de su síntesis, la sacarosa puede pasar a los conductos floemáticos a través de plasmodesmos moviéndose célula a célula (vía simplástica) o puede entrar a los conductos desde el apoplasto (vía apoplástica) por acción de los simportadores sacarosa-H<sup>+</sup> (Figura 3.1A). La descarga de sacarosa en células "sumidero" puede ocurrir directamente desde el apoplasto a través de transportadores de sacarosa o de forma alternativa, la sacarosa puede ser hidrolizada por acción de enzimas invertasas de la pared celular en glucosa y fructosa y estas moléculas adquiridas por acción de transportadores de monosacáridos (Azcón Bieto and Talón, 2008; Williams et al., 2000).

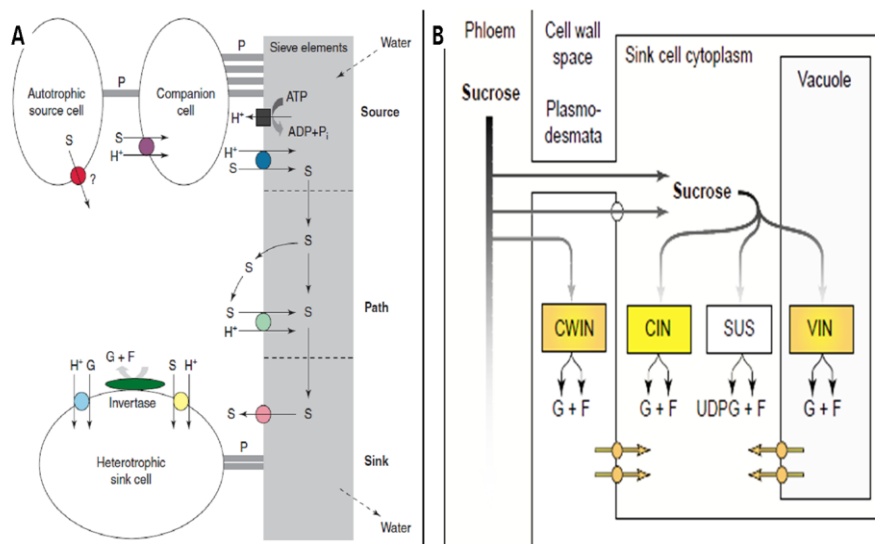


Figura 3.1. A) Esquema de la distribución de transportadores de sacarosa desde la célula de un órgano fotosintético ("fuente") a una célula no fotosintética "sumidero". Adaptado de Williams et al. 2000. B) Dependiendo de la ruta de entrada a la célula "sumidero" (simplástica o apoplástica), la sacarosa puede procesarse por la acción de las invertasas de la pared celular (CWIN), invertasas citoplasmáticas (CIN), sacarosa sintasa (SUS), o invertasa vacuolar (VIN). F, fructosa; G, glucosa. Adaptado de Koch, 2004.

La sacarosa puede ser procesada por la acción de las invertasas (sacarosa + H<sub>2</sub>O → glucosa + fructosa) o por la acción de las sacarosa sintasas (sacarosa + UDP <-

> fructosa + UDP-glucosa). La sacarosa citoplasmática es transportada frecuentemente al interior de las vacuolas para su hidrólisis por las invertasas vacuolares (VINs) (Figura 3.1B), que generan de esta forma tanto las hexosas derivadas, como las señales asociadas a estas moléculas (Koch, 2004). Este tipo de señales pueden alterar, tanto a nivel transcripcional y postranscripcional, la actividad de genes implicados en la percepción y la biosíntesis de determinadas fitohormonas como el ABA, giberelinas, auxinas y etileno (Rolland et al., 2006)

### **Metabolismo de sacarosa en el desarrollo del fruto de tomate**

Durante el desarrollo del fruto de tomate, como ocurre en otros órganos "sumidero", el aporte de sacarosa no es constante, diferenciándose dos fases: 1) un periodo de crecimiento rápido que ocurre desde 0 a 30-35 días después de anthesis (dpa) y 2) una fase de crecimiento lento desde 35 dpa hasta la maduración. Durante el primer periodo, la sacarosa es incorporada a través de plasmodesmos (vía simplástica) sin ser previamente hidrolizada y la acción de la enzima SUS sería predominante en la degradación de sacarosa. En el segundo periodo, junto con una disminución del número de plasmodesmos, la sacarosa se incorporaría vía apoplástica y sería hidrolizada por acción de las invertasas que pasarían a adquirir un papel predominante en la degradación de sacarosa (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001).

### *Papel de las invertasas vacuolares en la maduración del fruto*

Las invertasas vacuolares (VINs), al igual que las asociadas a la pared celular (CWINs), generan abundantes hexosas y señales derivadas de hexosas (Koch, 2004). Plantas transgénicas de tomate con baja actividad en invertasa vacuolar acumulan sacarosa en el fruto y muestran una reducción del tamaño del fruto del 30% (Klann et al., 1996). Ello sugiere que el principal papel de las invertasas en el fruto de tomate en estadio Rojo Maduro es el de mantener las concentraciones de hexosas, esto posibilita el continuo intercambio de azúcar entre el citosol y la vacuola y el mantenimiento de un ciclo de hidrólisis/resíntesis de sacarosa en el citosol celular (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001). TIV1 es una VIN que es producida en pericarpo de frutos de *S. lycopersicum* pero no se encuentra presente en pericarpo de frutos de otras especies de solanáceas que acumulan sacarosa en vez de hexosas, como *S. habrochaites*. Estas especies en cambio mantienen la actividad de las invertasas apoplásticas (Miron et al., 2002), y se ha comprobado que en frutos de *S. habrochaites* se produce un ciclo lento y continuado de hidrólisis/resíntesis de sacarosa (Miron et al., 2002). Esto sugiere un papel principal de las VINs en el procesado de sacarosa en el fruto mediante el control sobre el ciclo de hidrólisis/resíntesis de sacarosa facilitado por la compartimentación vacuolar, que añadiría la importación de sacarosa y funciones de señalización, a su papel en la expansión celular (Koch, 2004).



### Regulación de la actividad invertasa vacuolar en tomate

Se ha comprobado en varias especies vegetales que la expresión de genes que codifican invertasas responde a señales como son la concentración de azúcares, estímulos hormonales (principalmente IAA, citoquininas y ABA) y ambientales (Koch, 2004; Roitsch and Gonzalez, 2004; Trouverie et al., 2004). En tomate se sabe que *TIV1* está regulado negativamente por la concentración de glucosa (Godt and Roitsch, 1997) y por otra parte se ha comprobado que el promotor del gen *Lin5* (que codifica la expresión de una invertasa de la pared celular) responde positivamente al tratamiento con giberelinas, auxina y ABA, lo que indica un papel de regulación de invertasas por fitohormonas (Proels et al., 2003).

La relación hexosa/sacarosa disminuye en diferentes órganos, como el desarrollo de la semilla o la formación de órganos de almacenamiento, durante el paso de una elevada actividad meristemática a la diferenciación y acumulación de sustancias de reserva. Este cambio es debido a una represión eficiente de la actividad de CWIN y/o VIN (Rausch and Greiner, 2004). Los mecanismos moleculares de esta inhibición de las actividades de CWIN y VIN no se han esclarecido completamente, pero al parecer requieren mecanismos adicionales a los de la represión transcripcional.

En *Arabidopsis* la regulación de VINs requiere de la acción de un sistema enzimático de procesamiento vacuolar (sistema VPE<sub>v</sub>) para el marcaje y la degradación de la invertasa (Rojo et al., 2003). La represión de la actividad CWIN y VIN también depende de otros mecanismos post-traduccionales que implican proteínas inhibidoras. En 1994, se purificaron, de suspensiones celulares de tomate y tabaco, las primeras proteínas inhibidoras de invertasas. Ambas secuencias peptídicas presentaban una elevada similitud y en el caso de la proteína inhibidora en tabaco, se comprobó una co-localización con CWIN (Rausch and Greiner, 2004).

Recientemente, en tomate se ha identificado una proteína inhibidora de la actividad invertasa llamada SolyCIF que se expresa en hojas, flores y fruto verde cuya elevada afinidad *in vitro* sobre TIV1 ha permitido purificar esta proteína (Reca et al., 2008). Estos estudios indicaron, además, que la actividad de SolyCIF da lugar a que TIV1 sea degradada por acción proteolítica.

### Métodos de aislamiento de tipos celulares para estudios transcriptómicos

El aislamiento de células específicas mediante el uso de "cell sorters" de fluorescencia (FACS) se ha utilizado en sistemas animales y vegetales, para el posterior análisis transcripcional (Roy et al., 2002; Yongquan et al., 2002). La hipótesis de trabajo es que la expresión de un conjunto de genes en un tipo celular típico en una fase de desarrollo es la que le otorga un papel específico a ese tipo celular. Se han utilizado diversos métodos para extraer las células a partir de tejido; desde el tratamiento químico con tripsina o el uso de detección mediante anticuerpos de ARNm específico, hasta la microdissección de tejido fijado (Cowherd et al., 2004; Kerk et al., 2003; Nakazono et al., 2003; Takayuki et al., 2002); o el seguimiento de genes delatores en plantas transgénicas seguido de obtención de protoplastos y FACS (Birnbaum et al., 2005).

La producción de protoplastos es un método sencillo que requiere el uso de enzimas hidrolíticas que solubilizan la pared celular y permiten la extracción de un gran número de células. Además se ha descrito un procedimiento eficaz de obtención de protoplastos en fruto de tomate (Brown et al., 1997). La creciente utilización de genes delatores GFP y el desarrollo de técnicas de “cell sorting” han permitido una mayor eficiencia en el aislamiento de tipos celulares para su estudio transcriptómico (Birnbaum et al., 2005; Birnbaum et al., 2003).

En este trabajo, se utiliza la técnica de extracción mediante protoplastos y el aislamiento (por FACS) de un tipo o estadio transcriptómico caracterizado por la elevada actividad GFP dirigida por el promotor PFF específico de fruto (ver Capítulo 2), para su posterior estudio transcriptómico mediante análisis de micromatrices.

En *A. thaliana*, la caracterización transcriptómica de tipos celulares de raíz, mediante la técnica de extracción de protoplastos y su posterior aislamiento (Birnbaum et al., 2005), ha permitido asociar tipos celulares o expresión específica de tejido a la expresión de determinados factores de transcripción (Birnbaum et al., 2003), lo que ha posibilitado la elaboración de un “mapa” de expresión espacio-temporal de la raíz (Brady et al., 2007; Iyer-Pascuzzi et al., 2009). El fruto de tomate, al igual que la raíz, es un órgano formado por varios tejidos y tipos celulares con un perfil de expresión específico (Gillaspy et al., 1993; Lemaire-Chamley et al., 2005) (Figura IG1). Aunque diversos estudios han identificado la expresión aislada de determinadas células o tejidos en el fruto (Barg et al., 2005; Fernandez et al., 2009; Gillaspy et al., 1993, y otros), una caracterización transcriptómica a nivel celular como la realizada en este trabajo, es hasta el momento escasa. Nosotros proponemos que una aproximación como la empleada, ayudaría a esclarecer los procesos transcripcionales que ocurren a lo largo del desarrollo del fruto a un nivel más resolutivo.

## 3.2. Materiales y Métodos

### Material Biológico

Se utilizaron frutos de plantas TG2 de tomate (var. Money Maker) descendientes de plantas transformadas de manera estable con la construcción PFF:GFPGUS (promotor PFF:fusión GFP/GUS) (ver Capítulo 2). La selección de plántulas transgénicas se realizó mediante selección en Kanamicina y las plantas resistentes fueron cultivadas en invernadero a una temperatura entre los 20 y 24°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz. Estas plantas crecieron en una mezcla de turba y vermiculita y mediante riego por goteo se les proporcionó solución nutritiva (Hoagland n° 1) con oligoelementos. Los frutos de estas plantas se recogieron en fase IV de maduración y se comprobó la actividad de PFF:GFPGUS mediante tinciones GUS en fruto tal y como se explica en el Capítulo 2.

### Aislamiento de protoplastos de fruto de tomate

Se obtuvieron secciones transversales de aproximadamente 1mm de grosor de tomates PFF:GFPGUS en fase IV temprana utilizando un corta-fiambre (CF-172 Fagor, España). A continuación, aprox 10 g de secciones de frutos se incubaron durante 1 hora a 25 °C en 10 ml de **medio A** pH=5.5/KOH: 95 mM KCl, 65 mM MgCl<sub>2</sub>, 68 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 mM MES, 0.2% [p/v] BSA, 110 mM sorbitol. Seguidamente las secciones se transfirieron a una placa Petri que contenía 10 ml de **medio B2** pH=5.5/KOH: 0.10 M sorbitol, 77 mM KCl, 53 mM MgCl<sub>2</sub>, 55 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MES, 0.2% BSA, 0.2% PVP, 1% celulasa "ONOZUKA R10" (Duchefa, Haarlem, Holanda), 0.3% macerozima R10 (Duchefa, Haarlem, Holanda) y se incubaron a 25 °C en oscuridad durante 2-4 horas. Al finalizar el tiempo de digestión enzimática (Figura 3.2A), se añadieron, cuidadosamente, 10 ml de **medio A**, y los protoplastos en sobrenadante se pasaron a través de una membrana de nylon a un tubo de 15 ml, recogiendo por centrifugación primero durante 30 segundos a 10 x g y a continuación a 230 x g durante 90 segundos.

Para purificar los protoplastos, se eliminó primero el sobrenadante y se resuspendió el pellet con los protoplastos en 7 ml de una **solución 20% de Percoll** pH=5.5/KOH: 20% [v/v] Percoll (Sigma, USA) 40% [v/v] agua, 40% [v/v] solución SH (1.37 M sorbitol, 75 mM MES, 0.5% BSA y 0.5% PVP 40). A continuación se añadió cuidadosamente 1 ml de **medio A** en la parte superior y se centrifugó el tubo a 230 x g durante 2 minutos.

Después de esta centrifugación se observó la banda correspondiente a los protoplastos que estaba situada entre la **solución A** y la solución de Percoll (Figura 3.2B). Los protoplastos en esa zona del gradiente se recogieron con cuidado y se trasladaron a un tubo eppendorf utilizando una micropipeta para volúmenes de 1 ml con la punta cortada. Se evitó la exposición de los protoplastos a la luz, manteniéndolos siempre que fue posible en hielo y en oscuridad. Posteriormente, tanto para la observación de los protoplastos a través de un microscopio de

fluorescencia como para su separación mediante FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter; Centro de Investigación Príncipe Felipe) se trabajó con baja intensidad lumínica. La separación de protoplastos se realizó mediante un separador de células MoFlo Cell Sorter (Beckman-Coulter, CA, USA) utilizando una punta de 200  $\mu\text{m}$  y una presión de hasta 30 psi. Se determinó la emisión en fluorescencia verde (filtro 530/40 nm) para detección de GFP y la emisión en rojo (filtro 670/40 nm) para detectar la clorofila. Los datos fueron adquiridos y analizados con el programa Summit (Beckman-Coulter, CA, USA) y la separación se llevó a cabo en base a la región de fluorescencia correspondiente a la GFP.

### Extracción de ARN de protoplastos e hibridación de micromatrices

Para extracción de ARN, las muestras separadas por el FACS en protoplastos GFP+ y GFP- en tubos eppendorf de 1.5 ml, se traspasaron a tubos de 50 ml y se liofilizaron durante dos días. El liofilizado se resuspendió en 300  $\mu\text{l}$  de buffer RLT y el resto del proceso continuó, utilizándose el kit de extracción Rneasy Micro Kit (Qiagen) y siguiendo las indicaciones del fabricante para “extracción de ARN a partir de micro-disecciones”.

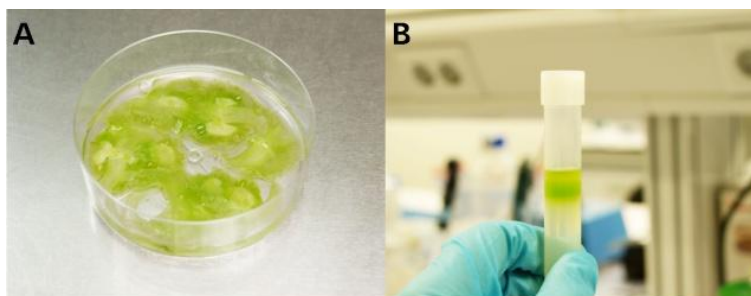


Figura 3.2. A) Cortes de tomate de 1mm de espesor después de 4 horas de digestión con celulasa y macerozima en placa Petri. B) La centrifugación a 230 x g produjo un gradiente de densidad que resultó en una interfase, de la que se extrajo una alícuota para su observación al microscopio.

Para las hibridaciones de micromatrices (ver capítulo 1 y <http://gbf.ensat.fr/chips/>) se utilizaron 100 ng de ARN por muestra, pero en este caso se utilizó el kit MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit (Ambion) y se realizaron dos rondas de amplificación del ARN utilizando un par de oligonucleótidos dT7 internos y que producen amplificados más cortos, según el protocolo del fabricante. Una vez marcadas las muestras con los fluoróforos Cy3 y Cy5, se procedió al procesado e hibridación de las micromatrices de oligonucleótidos EU\_TOM1\_12K (INRA/INP-ENSAT, Francia) cedidas por el laboratorio del Dr. Mondher Bouzayen, siguiendo las instrucciones disponibles en: <http://gbf.ensat.fr/chips/>.

El escaneo y el análisis de las imágenes se llevaron a cabo de manera similar a la descrita en el Capítulo 1 de esta tesis, utilizando los programas Genepix y Acuity (Axon Instruments, USA).

### **Tinción para la detección de granos de almidón**

Para detectar las células portadoras de granos de almidón, se utilizaron secciones de tomates PFF:GFPGUS, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación. Para ello, las secciones fueron deshidratadas en series crecientes de etanol con objeto de decolorar el tejido. Una vez decoloradas, se re-hidrataron y se tiñeron con una solución de I<sub>2</sub>KI o Lugol (Yodo-Yoduro de potasio) durante 5 minutos (Ruzin, 1999). Las regiones/células que acumulan almidón adquirieron el color marrón característico. En algunos casos la tinción se realizó después de la tinción GUS. Las fotografías fueron realizadas en un microscopio estereoscópico MZ16F (Leica).

### 3.3. Resultados

#### Caracterización del perfil de expresión GUS dirigido por el promotor PFF

La secuencia reguladora PFF con un tamaño de 3232 pb, se aisló a partir de la secuencia de ADN localizada aguas arriba del unigen SGN-U212902. Este gen codifica la expresión de una beta-fructofuranosidasa vacuolar putativa de *S. lycopersicum* posteriormente asociada a TIV1 (SGN-U314663), que corresponde a un enzima del grupo de proteínas llamadas invertasas vacuolares. El fragmento aislado contiene las mismas secuencias presentes en la región situada aguas arriba del gen de la invertasa vacuolar *tiv1* o *Lin4* ya descritas (Elliott et al., 1993) y que incluye como elementos característicos dos repeticiones en tándem de 166 pb y la caja TATA (Figura 3.3).

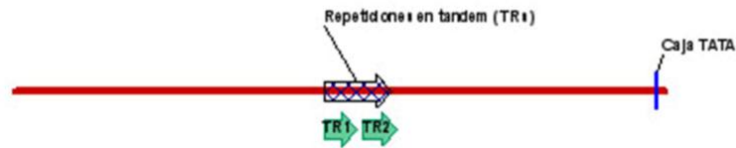


Figura 3.3. Estructura del promotor PFF. Representación de la secuencia promotora de 3232 pb aislada que abarca desde la posición -9 hasta la posición -3241 aguas arriba del inicio de transcripción. Se muestran las dos repeticiones directas en tándem de 166 pb situadas entre las posiciones -1708 y -1376 y la caja TATA en la posición -51.

La expresión de la fusión GFP:GUS dirigida por PFF, como ya se ha descrito en la segunda parte de este trabajo, sigue un patrón bifásico. La actividad GUS es baja durante la fase II del desarrollo del fruto incrementándose en el inicio de la fase III en la que se observó una mayor expresión del gen GUS en la parte central de la columela, pero la actividad decrece durante la expansión posterior del fruto (en la fase IIIb) para volver a incrementarse en la fase IV.

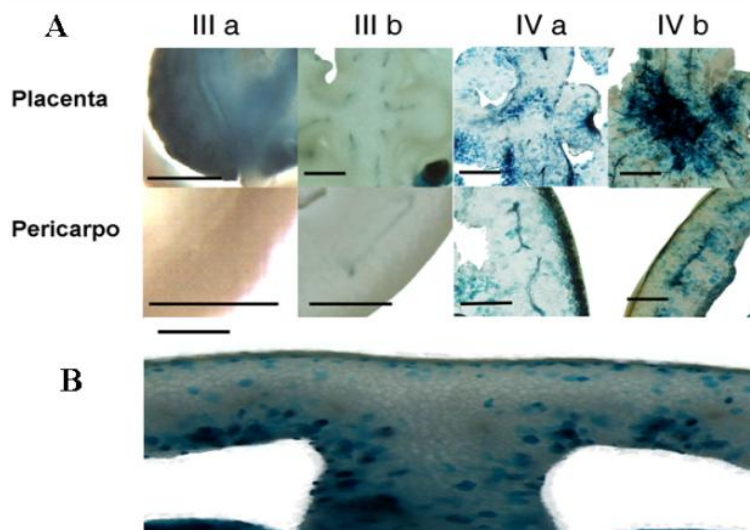


Figura 3.4. Patrón de expresión general y punteado dirigido por el promotor PFF en frutos de tomate. Análisis histoquímico GUS de cortes de frutos PFF:GFP:GUS. Los cortes de fruto de las plantas transgénicas se incubaron a 37°C durante toda la noche con sustrato de la glucuronidasa. Las barras representan 2 mm. A) imágenes de la placenta y pericarpo de cortes de frutos en las fases IIIa, IIIb, IVa y IVb. B) tinción GUS en una zona del pericarpo y septo correspondiente a un fruto en fase IVa.

El análisis de la actividad GUS dirigida por la secuencia reguladora PFF, reveló en frutos en fase IV, un patrón de actividad punteado que evidenciaba la expresión diferencial de la enzima glucuronidasa en determinadas células dispersas por el pericarpo y la columela. Este tipo celular o estadio transcriptómico así evidenciado, no se asociaba necesariamente con el tejido vascular y sin duda nos indicaba que no todas las células del pericarpo son iguales. Este patrón de expresión aumentaba (mayor número de células con altos niveles de expresión dirigida por PFF rodeadas de células con expresión indetectable por X-Gluc) en frutos en fase IV tardía (rojo/rojo maduro) y se extendía gradualmente desde la parte central del fruto al resto, siendo más frecuente en la zona correspondiente a la columela y la placenta y menos en la zona del pericarpo (Figura 3.4A y FS2B del Anexo III).

Con objeto de determinar si había alguna asociación entre las células con actividad del promotor PFF y el tamaño celular, se determinó el tamaño de células con alto, medio y bajo nivel de expresión dirigida por el promotor tanto en cortes como en protoplastos aislados de secciones de los mismos frutos. La actividad de PFF parecía tener lugar en células de tamaños muy distintos, con una distribución de tamaño celular similar a las de las células con baja actividad (Figura 3.4B y Anexo III Figura FS2).

Por otra parte, la frecuencia de distribución de este patrón punteado de actividad del promotor PFF resultó ser similar a la frecuencia de distribución de granos de almidón en cortes de fruto según se pudo poner de manifiesto mediante tinción doble GUS/lugol (ver Anexo III Figura FS1), aunque dicha asociación no se pudo confirmar a nivel celular.

#### **Análisis transcriptómico de protoplastos con actividad del promotor PFF.**

Parecía evidente que el promotor PFF, nos ponía de manifiesto la existencia de un tipo celular diferencial o estadio transcriptómico caracterizado por la alta actividad de PFF que se encontraba inmerso en diferentes tejidos del fruto, entre otras células morfológicamente similares pero que no mostraban actividad GUS.

Con objeto de averiguar si dichas células caracterizadas por altos niveles de actividad del promotor PFF poseían un programa específico de expresión génica, se realizó un estudio comparativo a nivel transcriptómico entre estas células (promotor PFF(+)) y el de las células de los alrededores (con nula o muy baja expresión de PFF, o PFF(-)). Para ello necesitábamos de un sistema de etiquetado/separación celular y nos aprovechamos de que la  $\beta$ -glucuronidasa utilizada como chivato de la actividad PFF llevaba fusionada la proteína GFP. Con objeto de separar las células con elevada actividad del promotor (GUS-GFP positivo) de las de escasa actividad del promotor (GUS-GFP negativo), se llevó a cabo primero el aislamiento de los protoplastos de estas células.

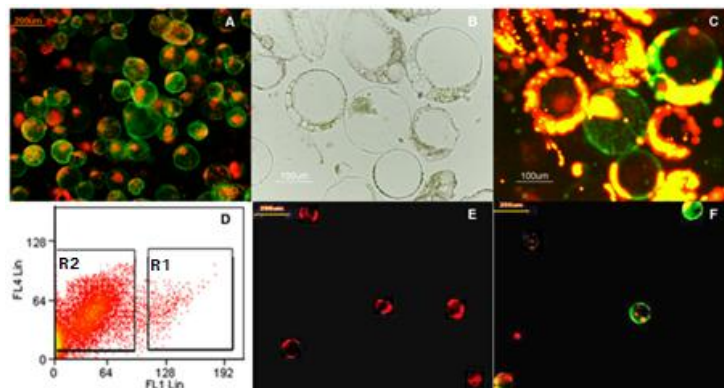


Figura 3.5. Aislamiento y separación de protoplastos de frutos de tomate PFF:GFPGUS. Después de la digestión enzimática, se procedió al aislamiento de protoplastos a partir de cortes de tomate de 1mm de espesor. A) imagen de microscopía de fluorescencia (filtro GFP) de protoplastos aislados a partir de frutos 35S:GFPGUS. B) imagen de protoplastos de tomates PFF:GFPGUS. C) la misma imagen con el filtro de detección de GFP. D) la representación de la relación entre los dos canales (Rojo/Verde) de los registros, permitió la delimitación y posterior separación de los protoplastos GFP-positivos (zona R1) de los GFP-negativos (zona R2). Posteriormente a la separación se observaron las muestras al microscopio. E) y F) imágenes de protoplastos GFP-negativos y GFP-positivos respectivamente iluminados con luz UV ( $\lambda_{\text{ex}}$  488 nm) para la detección de la proteína GFP.

El método de aislamiento de protoplastos se puso a punto inicialmente a partir de cortes de frutos de plantas 35S:GFPGUS transformadas de forma estable. Estos protoplastos se aislaron a partir de cortes de 1mm de espesor obtenidos de frutos después de efectuar digestiones de evaluación con las enzimas celulasa y macerozima (ver Materiales y Métodos) que fueron inicialmente de 16 horas y finalmente de 2 a 4 horas (Figura 3.5A).

La obtención de protoplastos de los frutos PFF:GFPGUS para los análisis transcriptómicos, se llevó a cabo siguiendo el procedimiento optimizado y con cortes transversales de 1 mm de frutos en fase IV temprana (ver Materiales y Métodos) y reduciendo a dos horas la etapa de digestión enzimática con el fin de minimizar los posibles efectos a nivel transcriptómico. Para obtener un rendimiento suficiente, se agruparon los protoplastos extraídos de cuatro frutos distintos y se analizaron dos eventos de transformación diferentes. La preparación de protoplastos se observó utilizando un microscopio de fluorescencia (Figura 3.5B y 3.5C) y un microscopio confocal para la detección de la proteína GFP y la distinción de protoplastos GFP(+) de los GFP(-). Las imágenes obtenidas de este modo sirvieron para estimar el tamaño de los protoplastos de ambas poblaciones así como la intensidad de fluorescencia (ver Anexo III Figura FS2) y confirmar la observación realizada con cortes histológicos de la falta de correlación entre tamaño y nivel de expresión de PFF.

Una preparación de protoplastos a mayor escala de frutos PFF:GFPGUS sirvió para el propósito de separar las dos poblaciones celulares (GFP(+) y GFP(-)) mediante un aparato separador de células fluorescentes (fluorescence-activated cell sorter o FACS) disponible en laboratorio del Dr. Enrique O'Connor del Centro de Investigaciones Príncipe Felipe (CIPF). El nivel basal de autofluorescencia se delimitó mediante el uso de protoplastos control (Birnbaum et al., 2005), obtenidos de frutos en fase IV de plantas silvestres. De este modo, se pudieron delimitar aquellos registros (GFP-positivos) con una intensidad de fluorescencia más elevada que la correspondiente a la de protoplastos con niveles de fluorescencia similares a los registrados en la muestra control



(Figura 3.5D). En total se contabilizaron unos 50.000 registros de los que 740 fueron considerados como GFP-positivos (zona R1 de la Figura 3.5D). Esta cantidad de aproximadamente 2% es inferior a la calculada a partir de las secciones teñidas con GUS y se debe seguramente a que durante el "cell sorting", descartamos protoplastos con bajos pero significativos niveles de GFP. Después del proceso de separación, gran parte de los protoplastos parecían conservar su apariencia original (Figura 3.5E y 3.5F), y las dos poblaciones sólo se diferenciaban por los niveles de fluorescencia GFP.

Una vez obtenidas las muestras de protoplastos GFP-positivos y GFP-negativos, se realizó un primer análisis mediante RT-PCRq en tiempo real a partir de ADNc obtenido de dichas células, con el fin de comparar los niveles de transcritos de la proteína GFP, de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa y del gen de la invertasa vacuolar SGN-U212902 entre las dos poblaciones de células que habíamos separado (Figura 3.6A). Los resultados de estos análisis mostraron que los protoplastos GFP(+) aislados mediante el "cell sorter", poseían niveles más elevados de transcritos correspondientes a los genes GUS, GFP y del gen endógeno que codifica esta invertasa vacuolar. Podíamos deducir por lo tanto que los protoplastos conservaban el patrón de expresión esperado de los genes marcadores y que estaba de acuerdo con los niveles de expresión del gen endógeno FF, por lo que podían ser utilizados para determinar otras diferencias a nivel transcriptómico.

Con objeto de averiguar el programa de expresión génica que caracterizaba a las células evidenciadas por la construcción PFF:GUS-GFP, se llevó a cabo un análisis transcripcional utilizando la micromatriz TOM2 que contiene aproximadamente 12200 oligonucleótidos distintos de 70 mer, correspondientes a 11700 genes de tomate. El análisis mediante micromatrices se llevó a cabo a partir del ARNa resultante de dos rondas de amplificación con diferentes pares de oligonucleótidos dT (ver Materiales y Métodos). Con objeto de hacer más robusto nuestro análisis, se utilizaron dos muestras de protoplastos procedentes de dos líneas transgénicas independientes la línea 8b y la línea 9a que mostraban el mismo fenotipo de expresión punteado antes descrito. Con la finalidad de realizar comparaciones entre todas las muestras se utilizó un diseño experimental basado en una referencia o "pool" de ARNa (Figura 3.6B).

Las hibridaciones se realizaron por triplicado entre el ARNa de la referencia y el ARNa de cada una de las muestras resultando un total de doce micromatrices (2 grupos celulares x 2 líneas transgénicas x 3 réplicas). Al igual que en la primera parte de este trabajo, para el análisis de micromatrices se seleccionaron aquellos "spots" con el doble de intensidad media que la intensidad debida al ruido de fondo y se aplicó la normalización LOWESS a cada una de ellas.

Tras la normalización de los datos, se creó un set general de datos en el que se consideraron como válidos aquellos "spots" presentes (según el filtro del doble de intensidad que el ruido de fondo) en al menos el 80% de las micromatrices del set de datos, obteniéndose un total de 1391 "spots". De éstos, 155 (11,14%) resultaron significativos en un test de la t-student que

comparaba las muestras GFP positivas frente a las GFP negativas con independencia del tipo de línea y considerando un nivel de significatividad límite del 0.05.

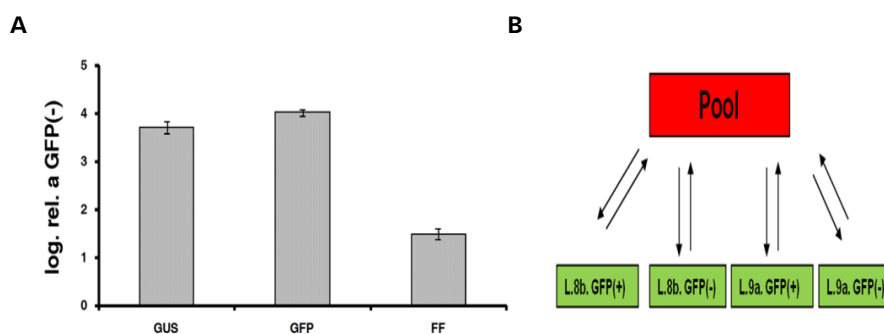


Figura 3.6. A) representación de los niveles de expresión relativos a las muestras GFP-negativas de los genes GFP, GUS e invertasa vacuolar (FF) (SGN-U212902). B) estrategia basada en una referencia o "pool" de ARNs utilizada para comparar las muestras GFP positivas con las GFP negativas procedentes de frutos de dos líneas transgénicas independientes (L8b y L9a).

El análisis de componentes principales (P.C.A.) del conjunto de datos de expresión para todas las muestras permitió determinar cuáles de estos genes con expresión diferencial contribuían más a la separación entre los protoplastos GFP positivos y los GFP negativos. Estos genes se seleccionaron por su contribución a la primera componente del análisis PCA que explicaba el 60% de la variabilidad y que separaba las muestras GFP positivas de las GFP negativas (Figura 3.7).

Las Tablas 3.1 y 3.2 muestran los genes que contribuyen de manera significativa a la separación entre muestras GFP positivas y muestras GFP negativas.

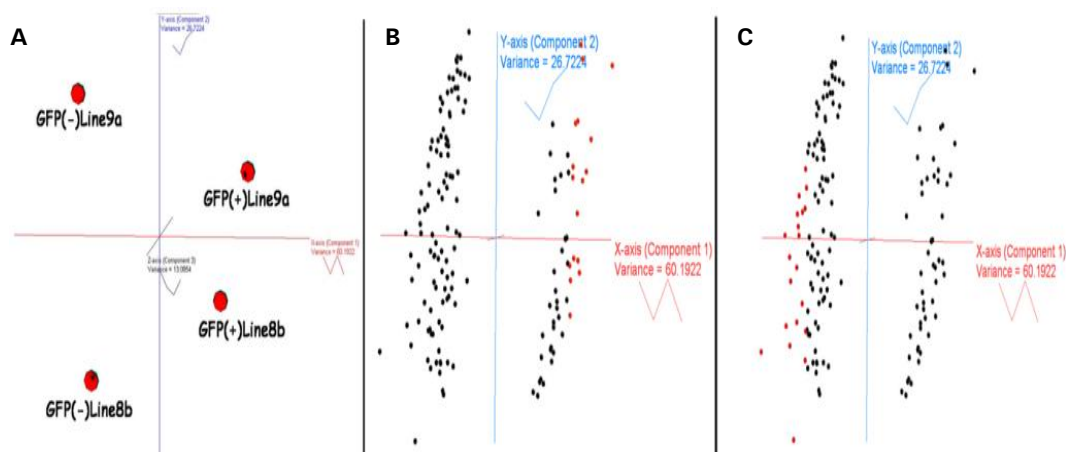


Figura 3.7. A) el análisis de componentes principales (PCA) mostró las muestras GFP positivas separadas de las GFP negativas según la primera componente que explicaba el 60% de la variabilidad. Los valores de esta componente permitieron determinar qué genes contribuían con un mayor peso (en rojo) en el caso de muestras GFP positivas (B) o en el caso de muestras GFP negativas (C).

Dado que PFF mostraba un patrón global de incremento de expresión asociado con la maduración, los genes de las Tablas 3.1 y 3.2 se analizaron con objeto de averiguar si el programa de las células PFF:GFP positivas correspondía a células con un programa de maduración local "avanzada" respecto de las PFF:GFP negativas adyacentes. Para ello se

identificaron aquellos genes que podemos definir como de maduración según la literatura y se anotaron en las tablas correspondientes, destacando con un superíndice aquellos genes que se ha descrito que muestran mayor expresión en fruto Verde Maduro, “breaker” o Rojo Maduro. Esta información se contrastó con la disponible en la base de datos de expresión en tomate Tomato Expression Database (T.E.D.) (<http://ted.bti.cornell.edu/>).

**Tabla 3.1.** Genes sobrerrepresentados en las muestras con mayor actividad del promotor PFF ordenados según su contribución determinada por los valores de la primera componente del PCA. Se muestran los valores de expresión relativos a las muestras GFP(-) en valores logarítmicos (“Fold change”) en las dos líneas (8b y 9a), así como los genes con mayor frecuencia de ESTs en la base de datos de expresión de tomate (T.E.D.) en fruto Verde Maduro (1), “breaker” (2) o Rojo Maduro (3).

Nombre	Fold change L8b	Fold change L9a	PCA. C.1	sgn-U2
Serine acetyltransferase	0.180	0.201	2.402	214945
bZIP transcription factor	0.379	0.156	2.020	219998
Ethylene ERF3 <sup>(2)</sup>	1.256	1.034	1.936	213917
WRKY transcription factor <sup>(1)</sup>	0.636	1.050	1.869	213637
chaperonin CPN60 HSP60	1.057	0.851	1.859	214952
leucinerich protein kinase putative	1.087	0.812	1.822	218197
leucinerich repeat family protein	0.619	0.899	1.821	213479
arginine decarboxylase 2 SPE2 <sup>(2)</sup>	0.348	0.246	1.793	212948
glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic putative	0.415	0.257	1.775	231265
pectinesterase family protein <sup>(2)</sup>	0.593	1.053	1.773	219249
phosphoenolpyruvate carboxylase putative <sup>(1)</sup>	0.392	0.138	1.733	214321
Betafructofuranosidase <sup>(3)</sup>	0.279	1.069	1.714	219276
tRNA binding region domain containing protein	0.376	1.259	1.691	220377
SEC14 cytosolic factor family protein	0.162	0.661	1.689	217299
betafructosidase BFRUCT3 <sup>(3)</sup>	0.797	1.344	1.657	212902
tryptophan synthase beta subunit	0.352	0.863	1.654	217467
aspartyl protease family protein	0.518	0.922	1.641	223048
acylCoA1 acylglycerol3 phosphate acyltransferase putative	0.512	0.443	1.607	218097
SNF7related	0.102	0.802	1.604	216733
expressed protein	0.564	1.059	1.592	215389
not assigned	0.93	1.981	1.591	224729
Phototropic responsive	0.914	0.676	1.583	215447
aldolase putative	1.385	0.482	1.559	213303
Kinase related	0.635	0.607	1.557	223247
cytochrome c putative	0.256	0.843	1.514	214899
NAM family protein	0.705	0.286	1.497	214780
malate synthase putative	0.154	1.281	1.467	215030
histidine acid phosphatase family protein	0.281	0.246	1.446	215225

Tabla 3.2. Genes sobrerrepresentados en las muestras con menor actividad del promotor PFF ordenados según su contribución determinada por los valores de la primera componente del PCA. Se muestran los valores de expresión relativos a las muestras GFP(-) en valores logarítmicos ("Fold change") en las dos líneas (8b y 9a), así como los genes con mayor frecuencia de ESTs en la base de datos de expresión de tomate (T.E.D.) en fruto Verde Maduro (1), "breaker" (2) o Rojo Maduro (3).

Nombre	Fold change L8b	Fold change L9a	PCA. C1	sgn-U2
stomatal cytokinesis defective	-0.404	-0.291	-1.851	216668
tubulin beta8 chain TUB8	-0.473	-0.623	-1.385	212622
CTP synthase putative	-0.394	-1.025	-1.291	213898
1433 protein GF14 omega GRF2	-0.404	-0.520	-1.275	213061
60S ribosomal protein	-0.496	-0.350	-1.186	213294
oxidoreductase 2OGFell oxygenase	-0.398	-0.774	-1.146	215883
60S ribosomal protein L4L1 RPL4A	-0.339	-0.355	-1.139	214558
glyceraldehyde3phosphate dehydrogenase cytosolic GAPC	-0.297	-0.763	-1.138	236488
pectin methylesterase putative <sup>(1)</sup>	-0.151	-0.729	-1.120	213186
pyruvate kinase putative	-0.488	-0.725	-1.106	214153
histone H3	-0.294	-0.644	-1.105	214676
steroid sulfotransferase putative	0.064	-0.639	-1.038	215649
40S ribosomal protein S14 RPS14B	-3.306	-3.187	-1.032	213445
vacuolar processing enzyme gamma <sup>(1)</sup>	-0.076	-0.317	-0.985	215158
carbonic anhydrase putative <sup>(3)</sup>	-0.748	-1.610	-0.979	213844
ATPase subunit 1 <sup>(2)</sup>	-0.945	-1.168	-0.964	215744
adenylate kinase family protein	-0.625	-0.547	-0.960	214214
GATA transcription factor 1	-2.016	-0.973	-0.958	218025
transport protein particle TRAPP component Bet3 putative <sup>(3)</sup>	0.042	-0.693	-0.935	216374
Ethylene responsive transcriptional coactivator putative	-0.397	-1.590	-0.928	219850
CP12 domain containing protein	-0.773	-0.407	-0.917	215864
Asparaginyl tRNA synthetase 1 cytoplasmic <sup>(1)</sup>	-0.462	-1.223	-0.913	215530
20S proteasome beta subunit C1 PBC1 PRCT	-0.976	-0.774	-0.912	215903
expressed protein	-0.606	-0.196	-0.902	214572
transferase family protein <sup>(2)</sup>	-1.273	-0.810	-0.897	212578
transcription factor homeobox VAHOX1 <sup>(2)</sup>	-2.558	-1.370	-0.876	213417
acetolactate synthase <sup>(1)</sup>	-0.717	-0.209	-0.863	213768
glucosidase glucan 1-3-beta glucosidase <sup>(3)</sup>	-0.296	-1.072	-0.860	215716
2-oxoglutarate dependent dioxygenase putative <sup>(2)</sup>	-0.250	-0.964	-0.853	212798
histone H4	-0.910	-0.641	-0.829	213397
60S ribosomal protein L3 RPL3B	-0.007	-0.858	-0.828	213040
elongation factor 1alpha <sup>(1)</sup>	-1.101	-0.476	-0.824	212837
expressed protein <sup>(2)</sup>	-0.244	-0.268	-0.807	213666
Ripening related protein fruit-specific <sup>(2)</sup>	-0.507	-0.519	-0.802	231977
40S ribosomal protein S3A RPS3aB	-1.397	-0.444	-0.785	212980
60S ribosomal protein L15 RPL15A	-0.684	-0.277	-0.784	213003
60S ribosomal protein L12 RPL12C	-0.086	-0.650	-0.763	215162
elongation factor 1alpha <sup>(1)</sup>	-0.684	-2.336	-0.761	212840
Ubiquitin conjugating enzyme family protein <sup>(1)</sup>	-0.960	-0.270	-0.761	212836

Estos datos de expresión relativa, se introdujeron en la plataforma Plant MetGenMap proporcionada por la Universidad de Cornell (<http://bioinfo.bti.cornell.edu/>) con el fin de determinar qué rutas metabólicas principales o que subcategorías de estas rutas resultaban afectadas de manera estadísticamente significativa. Se utilizó para ello la corrección de Bonferroni y se consideró un límite de significatividad del 0.05. Las Tablas 3.3 y 3.4 muestran las rutas significativamente representadas en el caso de los genes sobrerrepresentados en las

células que muestran alta actividad del promotor PFF (Tabla 3.1) y en el caso de los genes infra-expresados en las mismas células (Tabla 3.2).

**Tabla 3.3. Rutas metabólicas con cambios estadísticamente significativos en el caso de protoplastos con mayor actividad del promotor PFF (GFP(+)).**

Pathway name	p value (adjusted)
fructose degradation to pyruvate and lactate (anaerobic)	0.00107
superpathway of glycolysis, pyruvate dehydrogenase, TCA, and glyoxylate bypass	0.00107
gluconeogenesis	0.00107
glycolysis IV (plant cytosol)	0.00107
glucose heterofermentation to lactate I	0.00107
glucose fermentation to lactate II	0.00107
superpathway of glycolysis and TCA variant VIII	0.00107
glycolysis I	0.00107
sucrose degradation to ethanol and lactate (anaerobic)	0.00107
superpathway of glycolysis + Entner-Doudoroff	0.00107

**Tabla 3.4. Rutas metabólicas con cambios estadísticamente significativos en el caso de protoplastos con poca o nula actividad del promotor PFF (GFP(-)). \*Según el programa Mapman.**

Pathway name	p value (adjusted)
superpathway of histidine, purine and pyrimidine biosynthesis	3.45e-05
protein synthesis. misc. ribosomal protein*	0.00358
purine nucleotides de novo biosynthesis I	0.00374
de novo biosynthesis of pyrimidine ribonucleotides	0.00374

El programa Mapman (Thimm et al., 2004) mostró resultados similares a los obtenidos mediante la aplicación desarrollada en Cornell, si bien la categoría de síntesis proteica como tal, aparece reflejada como significativa en la aplicación de Mapman para protoplastos GFP negativos (Tabla 3.4).

Estos resultados parecen indicar que el metabolismo de carbohidratos estaría activado en las células con elevada actividad del promotor PFF, y por el contrario éstas serían menos activas en la síntesis de nucleótidos y proteínas que las células adyacentes con menos actividad de este promotor. Es posible que el tipo celular evidenciado corresponda a un estadio metabólico por el que pasen consecutivamente todas las células del fruto maduro. Para confirmar esta hipótesis hacen falta llevar a cabo más experimentos, especialmente de técnicas de seguimiento no destructivas.

### 3.4. Discusión

Las invertasas vacuolares (VINs) contribuyen al aporte de hexosas principalmente durante el crecimiento de tejidos sumidero, por una parte produciendo solutos osmóticamente activos en la vacuola para su expansión, y por otra ajustando la expansión del tejido en relación al aporte de carbohidratos (Koch, 2004). El gen *tiv1* que codifica la expresión de una invertasa vacuolar, controla la relación sacarosa/hexosas en frutos maduros de *S. lycopersicum*, aunque podría haber otras invertasas adicionales implicadas en el proceso (Miron et al., 2002).

En este trabajo, la expresión GUS dirigida por el promotor PFF correspondiente a una invertasa vacuolar putativa (FF, de FructoFuranosidasa–invertasa) asociada a *tiv1*, en frutos en fase IV, reveló un patrón de actividad punteado que era más intenso en la zona de la placenta y columela, y que parecía extenderse al pericarpo a lo largo del proceso de maduración (Figura 3.4A). Una observación a mayor aumento permitió poner de manifiesto que el patrón punteado se debe a que algunas células presentan niveles altos de expresión del gen repórter dirigido por PFF en un contexto de células aparentemente de idéntica morfología y situación, pero con nula o muy baja expresión del gen delator. Proponemos que nuestra construcción está revelando un estadio transcriptómico o un tipo celular específico cuya diferenciación adquiere importancia creciente a lo largo del proceso de maduración del fruto. Las mediciones de tamaño de protoplastos así como las tinciones de actividad GUS realizadas, muestran la escasa correlación entre tamaño celular y actividad del promotor PFF, lo que sugiere que un mayor volumen vacuolar existente en las células de frutos en estadios más avanzados no parece estar en correlación con una mayor actividad del promotor PFF y por consiguiente con una mayor capacidad de acumular más invertasa como se ha sugerido (D'Aoust et al., 1999).

Las tinciones con lugol (Figura FS1. Anexo III) mostraron una distribución heterogénea del almidón en cortes de fruto, que en el pericarpo formaría un gradiente hacia el interior del fruto que es donde el patrón punteado de actividad GUS dirigida por PFF presenta mayor densidad de células positivas, lo que conjuntamente podría indicar la existencia de una distribución heterogénea de hexosas producto de la acción de las invertasas vacuolares. Por otra parte, es sabido que la presencia de glucosa en el medio regula de forma negativa la expresión del gen *TIV1* en suspensiones celulares (Godt and Roitsch, 1997). Aunque desconocemos si este mecanismo de regulación actúa regulando el nivel de actividad del promotor PFF, en caso de que así fuera, sería de esperar que la compartimentación de hexosas (glucosa y fructosa) en la vacuola afectara al número de células con actividad apreciable del promotor PFF durante la maduración, y esto podría explicar lo observado en las tinciones GUS.

En el fruto, el papel de las invertasas adquiere mayor importancia durante la fase de crecimiento lento del fruto (a partir de 25-35 dpa aproximadamente) lo que coincide con un mayor aporte de sacarosa por vía apoplástica y una reducción de la actividad de la sacarosa sintasa (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001). Los datos obtenidos mediante ensayos RT-PCRq en este trabajo, revelaron que una mayor actividad de la secuencia promotora PFF estaba en consonancia con mayores niveles

de expresión del gen *FF* endógeno que codifica la invertasa vacuolar putativa (Figura 3.6). Sin embargo los niveles de expresión de *FF* resultaron ser significativamente menores que los niveles de expresión observados de *GFP* y *GUS*, lo que podría deberse a una menor estabilidad del ARN mensajero de *FF* con respecto al ARNm de *GFP* y *GUS*.

El análisis transcriptómico de ambas poblaciones celulares (uno con alta actividad del promotor PFF y el otro con baja o nula actividad del mismo), reveló que ambas expresaban genes relacionados con el proceso de maduración descartando el posible desequilibrio transcripcional por un hipotético “adelanto” en el programa transcripcional general de maduración de las células con alta actividad del promotor PFF. En las células GFP negativas o de baja actividad del promotor PFF encontramos sobre-expresados algunos genes de maduración, entre ellos genes de remodelación de la pared celular como pectin metilesterasa o beta-glucosidasa que presentan mayor número de ESTs en genotecas correspondientes a estadios “breaker” o Rojo Maduro (Tabla 3.2). En cuanto a genes relacionados con la actividad invertasa, resulta interesante la sobre-expresión del gen que codifica la proteína de procesamiento vacuolar gamma ( $VPE_{\gamma}$ ) en las células PFF(-). En *Arabidopsis* la regulación de las VINs a nivel proteico implica la compartimentación de estas enzimas en el interior de la vesícula precursora de proteasa (PPV) y la del sistema enzimático de procesamiento vacuolar ( $VPE_{\gamma}$ ) que pre-procesa a la invertasa para su posterior degradación (Rojo et al., 2003). Los mayores niveles de expresión de  $VPE_{\gamma}$  en las células GFP(-) sugieren la existencia de un control a nivel transcripcional de la actividad VPE que podría regular la actividad invertasa en frutos de *S. lycopersicum*.

Entre los genes sobre-expresados en las células PFF(+) de los frutos en fase Verde Maduro (MG) se encuentran algunos que normalmente están sobrerrepresentados en los estadios “breaker” o Rojo Maduro. Entre ellos encontramos dos genes que codifican enzimas betafructofuranosidasas, una de las cuales corresponde al mismo unigen (SGN-U212902) del que se aisló la secuencia promotora, esta vez anotado como beta-fructofuranosidasa FRUCT3 según la anotación SGN-U3 utilizada en el análisis de la micromatriz de oligonucleótidos TOM2. En contraste, también se encuentran sobrerrepresentados algunos genes cuya expresión es más alta en el estadio Verde Maduro que en estadios más avanzados de maduración, como el que codifica un factor de transcripción WRKY.

El estudio de categorías funcionales reveló que las células PFF(+) presentan cambios significativos en rutas metabólicas relacionadas con el metabolismo de azúcares, debido a la sobre-expresión de algunos genes que codifican enzimas que intervienen en el llamado ciclo “fútil” de degradación y re-síntesis de sacarosa (Figura 3.8) en el interior celular (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001). El hecho de que aparezcan sobrerrepresentadas dos rutas de carácter antagónico; glicólisis, una ruta catabólica, y gluconeogénesis, una ruta anabólica, refuerza esta idea. Ello se debe fundamentalmente a la sobrerrepresentación significativa de genes que pueden intervenir tanto en la síntesis como en la degradación de sacarosa, como es el caso de los que codifican la expresión de la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa y la fosfoglicerato quinasa.

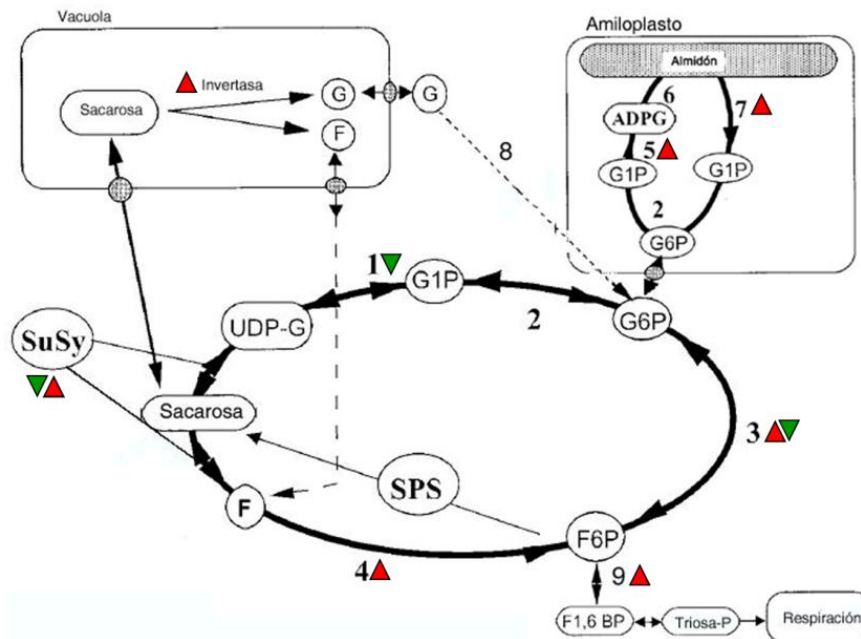


Figura 3.8. Esquema de los tres ciclos “fútiles” implicados en el metabolismo de la sacarosa en el interior celular. La sacarosa se degrada en el citosol mediante la sacarosa sintasa (SuSy) y la re-síntesis de la misma por la sacarosa fosfo-sintasa (SPS). Un cuarto ciclo “fútil” se produciría en el exterior celular en el que las invertasas apoplásticas degradan la sacarosa y las hexosas entran en el citosol para la síntesis de sacarosa por la acción de SuSy y SPS. La inducción y represión significativas en los protoplastos GFP-positivos respecto a los GFP-negativos, están representadas por flechas rojas y verdes respectivamente. Enzimas: (1) UDP-glucosa pirofosforilasa, (2) fosfoglucomutasa, (3) fosfoglucoisomerasa, (4) fructoquinasa, (5) ADP-glucosa pirofosforilasa, (6) almidón sintasa, (7) almidón fosforilasa, (8) glucoquinasa y hexoquinasa, (9) aldolasa. Adaptado de Nguyen-Quoc and Foyer, 2001.

Las células PFF(-) se caracterizarían, por una mayor actividad en síntesis proteica (mayor expresión relativa de proteínas ribosomales), y mayor actividad de síntesis y remodelación del ADN nuclear (síntesis de histonas, y tubulinas) que las células PFF(+). Este resultado junto con la observación de que este último grupo celular aumenta durante la maduración pasando de menos del 10% en estadio de Verde Maduro-Breaker (Fase IVa) a un 28% en rojo/rojo maduro (Fase IVb) aproximadamente (Anexo III. Figura FS2B), sugiere un papel de estas células dirigido hacia la síntesis y almacenamiento de moléculas específicas, lo que es característico de órganos sumidero, como es el caso del fruto de tomate, y que al final determinarán si no todas, algunas de las propiedades organolépticas del mismo. La síntesis de histonas y remodelación de ADN nuclear podrían ser indicativos de una mayor actividad de endoreduplicación en las células PFF(-). La endoreduplicación consiste en una duplicación cromosómica en la que los cromosomas adquieren segundas cromátidas sin alterar el número de cromosomas (D’Amato, 1964). Durante el desarrollo del fruto de tomate, desde los 10 dpa hasta la maduración, el pericarpio y el tejido locular se caracterizan por un incremento de la ploidía (Bergervoet et al., 1996; Joubès et al., 1999; Bertin et al., 2003). El tamaño celular está relacionado con el nivel de ploidía, al que se llega a través de la endoreduplicación (Galbraith et al., 1991), y se ha comprobado que el incremento de la ploidía celular debida a fenómenos de endoreduplicación correlaciona con el tamaño del fruto de tomate (Cheniclet et al., 2005). Los resultados obtenidos, podrían sugerir que las células PFF(+) no estarían implicadas en procesos de incremento de tamaño celular, pero lamentablemente nuestras observaciones tanto en protoplastos como en cortes de tejido, no



parecen indicar que haya una asociación entre tamaño celular y actividad de PFF. En cualquier estadio de desarrollo del fruto encontramos células de diferentes tamaños con altos niveles de expresión de PFF:GFP o PFF:GUS. No parece pues que las células con mayor nivel de expresión dirigida por el promotor sean células grandes con mayor nivel de ploidía o células pequeñas con menor. Además, aunque el nivel de ploidía del pericarpo aumenta desde la antesis hasta la maduración (Bergervoet et al., 1996; Bertin et al., 2003), el cambio no es significativo en el paso MG/Breaker (Cheniclet et al., 2005), sin embargo nuestros resultados indican que el número de células PFF(+) continua aumentando significativamente después del estadio Breaker. Una hipótesis plausible es que el PFFGFP nos evidencia más que un tipo celular, un estado celular caracterizado por una gran actividad metabólica con poca inversión en maquinaria proteica o de ADN. Puede que ese estadio metabólico sea temporalmente transitorio o que solo afecte a algunas células en los diferentes tejidos. No debemos de olvidar que la tinción GUS o GFP nos proporciona una instantánea de un proceso dinámico a través del cual no se puede descartar que pasen el resto de las células del fruto durante la maduración. Lo que también parece evidente es que aunque la frecuencia de células PFF(+) aumenta con la maduración, éstas son siempre una minoría. Ello nos revela que al menos en lo que respecta al programa de maduración relacionado con PFF, éste no ocurre simultáneamente en todas las células del pericarpo, sino en diferentes células a lo largo de la maduración.

En resumen la construcción PFF:GFP:GUS revela una heterogeneidad existente entre células correspondientes a tejidos diferentes, y que está basada en células con un metabolismo de carbohidratos más activo que las células vecinas, al menos desde un punto de vista transcriptómico.

En general los procesos que caracterizan la maduración del fruto del tomate han sido estudiados con detalle (Brummell and Harpster, 2001), e implican la participación de diferentes mecanismos moleculares que interaccionan entre ellos y cuya acción se encuentra influenciada a su vez por factores ambientales. Sin embargo la acción de estos procesos no es equivalente en todos los tejidos del fruto, según revelan los cambios transcriptómicos encontrados en distintas partes del fruto, y los cambios en los metabolitos. En resumen, los cambios asociados a la maduración muestran diferencias a nivel de tejido y evolucionan con la maduración de forma paralela (Lemaire-Chamley et al., 2005). La utilización de herramientas que nos proporcionan una resolución a nivel celular como la utilizada en esta parte de la tesis, ha resultado exitosa en la caracterización transcriptómica de tipos celulares de raíz en *A. thaliana* (Birnbaum et al., 2003), lo que ha permitido elaborar un mapa transcriptómico de tipos celulares de raíz (Brady et al., 2007, Iyer-Pascuzzi et al., 2009). El uso de esta estrategia, sin precedentes en fruto de tomate, nos permitirá mediante la aplicación de construcciones promotor de maduración::GUS:GFP, una mejor comprensión de los complejos procesos que caracterizan el desarrollo y maduración del fruto.

Anexo III

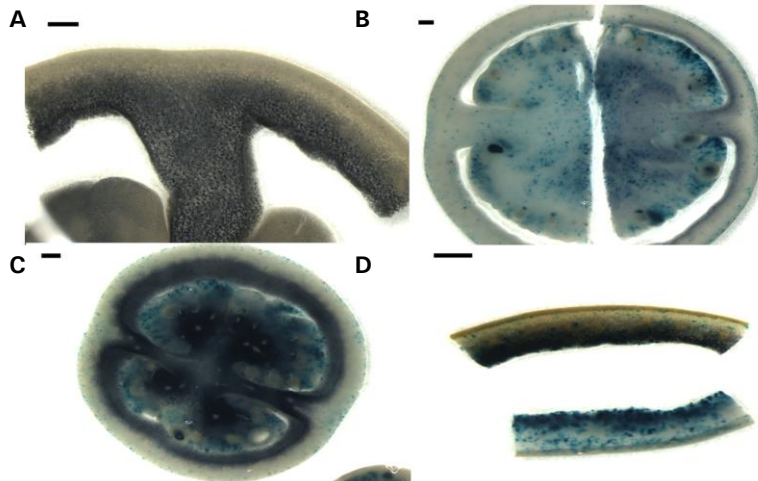


Figura FS1. Distribución de almidón y de actividad del promotor PFF en frutos de tomate. Cortes de tomate teñidos con Lugol en los que se muestra la distribución del almidón en cortes de frutos PFF:GFPGUS en fase IVa. Las barras representan 2 mm. A) sección de corte de fruto teñido con Lugol. B) dos mitades de un corte de fruto PFF:GFPGUS, en la mitad izquierda sólo se muestra la tinción GUS y en la mitad derecha la tinción GUS seguida de la tinción con Lugol (tinción GUS+Lugol). C) corte de fruto PFF:GFPGUS después de las dos tinciones. D) dos secciones de pericarpo correspondiente a un mismo corte, una sección con tinción GUS (parte inferior) y la otra con GUS +Lugol (parte superior).

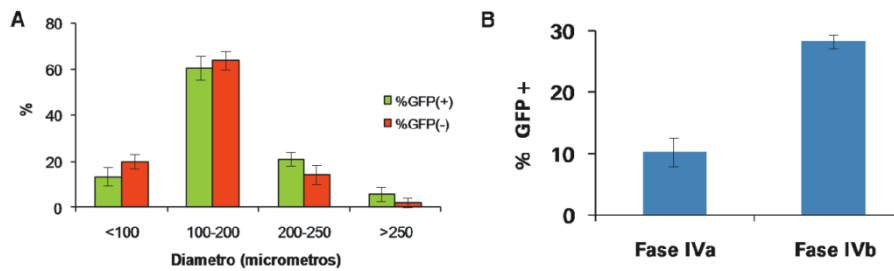


Figura FS2. A) Distribución según el diámetro de los protoplastos con alta actividad del promotor PFF (GFP positivas) y con baja actividad del promotor PFF (GFP negativas). B) % de células con actividad del promotor PFF en pericarpo de frutos en Fase IVa y de frutos en Fase IVb (Figura3.4). Las barras representan el % medio (media aritmética) de tres series de medidas o recuentos +/-SD.

## **Conclusiones**



## Conclusiones del Capítulo 1

C1.1. La aplicación exógena de auxinas o giberelinas conduce a la activación de un programa de desarrollo común con el de la fertilización, discerniéndose efectos específicos de fitohormona o debidos a la fertilización (desarrollo embrionario) que determinan el tamaño final del fruto. Este programa se activa de manera más rápida por efecto de las auxinas.

C1.2. El tratamiento exógeno inductor de la fructificación con fitohormonas giberelinas o auxinas tiene un efecto durante la fase de maduración que afecta al contenido en sólidos solubles y la composición metabólica del pericarpo del fruto de tomate.

C1.3. El fruto de plantas <sup>as</sup>SIDELLA comparte gran parte del programa del desarrollo con ovarios inducidos mediante tratamiento exógeno con giberelinas, sin embargo, se caracteriza por tener más activada la respuesta a estrés biótico.

## **Conclusiones del Capítulo 2**

C2.1 Basándose en análisis transcriptómicos, se han aislado y caracterizado seis nuevas secuencias promotoras con actividad en el fruto de tomate (PNH, PLI, PLE, PFF, PHD y PSN). Estas secuencias proporcionan un amplio rango de actividades promotoras en el fruto, tanto en intensidad como en especificidad y en distribución espacio-temporal.

C2.2 Se ha desarrollado una colección combinatorial de vectores Gateway diseñada para expresión recombinante en fruto de tomate (pENFRUIT). Esta colección incorpora los nuevos promotores descritos en este trabajo, junto a otros siete descritos previamente en la literatura. pENFRUIT permite un total de setenta y ocho combinaciones posibles para la expresión de un gen de interés en el fruto de tomate, cubriendo un rango amplio de tejidos y estadios de desarrollo. Además permite su aplicación a estrategias de ARNi<sup>hp</sup> con la finalidad de silenciar un gen de manera específica en un tejido u órgano determinado.

### Conclusiones del Capítulo 3

C3.1. Se ha identificado y aislado un nuevo tipo o estadio transcriptómico celular (células PFF(+)) en pericarpo de tomate, caracterizado por una elevada actividad del promotor PFF, que dirige la expresión de una putativa invertasa vacuolar específica de fruto.

C3.2 El número de células PFF(+) aumentó durante la maduración y el tamaño de estas fue variable y no difirió en distribución del de otros tipos/estadios celulares.

C3.3 Los resultados del análisis transcriptómico mostraron un programa de expresión génica específico de las células PFF(+), caracterizado por una mayor expresión de genes relacionados con la síntesis o aprovechamiento de sacarosa, y por una menor actividad de síntesis de proteínas y remodelación de la cromatina que el que presentaron las células adyacentes con escasa o nula actividad del promotor PFF.





## **Bibliografía**



## BIBLIOGRAFÍA

- Achard P, Renou JP, Berthome R, Harberd NP and Genschik P (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol* **18**:656-660.
- Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D and Harberd NP (2003) Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* **15**:2816-2825.
- Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R and Dopazo J (2005) Discovering molecular functions significantly related to phenotypes by combining gene expression data and biological information. *Bioinformatics* **21**:2988-2993.
- Al-Shahrour F, Minguez P, Vaquerizas JM, Conde L and Dopazo J (2005) BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res* **33**:W460-464.
- Alabadi D, Aguero MS, Perez-Amador MA and Carbonell J (1996) Arginase, Arginine Decarboxylase, Ornithine Decarboxylase, and Polyamines in Tomato Ovaries (Changes in Unpollinated Ovaries and Parthenocarpic Fruits Induced by Auxin or Gibberellin). *Plant Physiol* **112**:1237-1244.
- Alba R, Fei Z, Payton P, Liu Y, Moore SL, Debbie P, Cohn J, D'Ascenzo M, Gordon JS, Rose JK, Martin G, Tanksley SD, Bouzayen M, Jahn MM and Giovannoni J (2004) ESTs, cADN microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J* **39**:697-714.
- Alba R, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD and Giovannoni JJ (2005) Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* **17**:2954-2965.
- Ampomah-Dwamena C, Morris BA, Sutherland P, Veit B and Yao JL (2002) Down-regulation of TM29, a tomato SEPALLATA homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiol* **130**:605-617.
- Aparicio S, Morrison A, Gould A, Gilthorpe J, Chaudhuri C, Rigby P, Krumlauf R and Brenner S (1995) Detecting conserved regulatory elements with the model genome of the Japanese puffer fish, *Fugu rubripes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:1684-1688.
- Azcón Bieto J and Talón M (2008) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid.Barcelona:McGraw Hill Interamericana ;Edicions Universitat de Barcelona.
- Barg R, Sobolev I, Eilon T, Gur A, Chmelnitsky I, Shabtai S, Grotewold E and Salts Y (2005) The tomato early fruit specific gene *Lefsm1* defines a novel class of plant-specific SANT/MYB domain proteins. *Planta* **221**:197-211.
- Baxter CJ, Carrari F, Bauke A, Overy S, Hill SA, Quick PW, Fernie AR and Sweetlove LJ (2005) Fruit carbohydrate metabolism in an introgression line of tomato with increased fruit soluble solids. *Plant Cell Physiol* **46**:425-437.
- Bergervoet J, Verhoeven H, Glijssen L, Bino R (1996. ) High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) pericarp. *Plant Sci* **116**: 141-145.
- Bertin N, Borel C, Brunel B, Cheniclet C, Causse M (2003. ) Do genetic make-up and growth manipulation affect tomato fruit size by cell number, or cell size and DNA endoreduplication? *Ann Bot (Lond)* **92**: 415-424
- Birnbaum K, Jung JW, Wang JY, Lambert GM, Hirst JA, Galbraith DW and Benfey PN (2005) Cell type-specific expression profiling in plants via cell sorting of protoplasts from fluorescent reporter lines. *Nat Methods* **2**:615-619.
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW and Benfey PN (2003) A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science* **302**:1956-1960.
- Brady SM, Orlando DA, Lee JY, Wang JY, Koch J, Dinneny JR, Mace D, Ohler U and Benfey PN (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* **318**:801-806.
- Brown MM, Hall JL and Ho LC (1997) Sugar uptake by protoplasts isolated from tomato fruit tissues during various stages of fruit growth. *Physiologia Plantarum* **101**:533-539.
- Brummell DA and Harpster MH (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **47**:311-340.
- Bruno AK and Wetzel CM (2004) The early light-inducible protein (ELIP) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* **55**:2541-2548.
- Busi MV, Bustamante C, D'Angelo C, Hidalgo-Cuevas M, Boggio SB, Valle EM and Zabaleta E (2003) MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Mol Biol* **52**:801-815.
- Cai X, Wang C, Xu Y, Xu Q, Zheng Z and Zhou X (2007) Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector. *Virus Res* **125**:169-175.
- Carmi N, Salts Y, Dedicova B, Shabtai S and Barg R (2003) Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary. *Planta* **217**:726-735.
- Carrari F, Baxter C, Usadel B, Urbanczyk-Wochniak E, Zanon MI, Nunes-Nesi A, Nikiforova V, Centero D, Ratzka A, Pauly M, Sweetlove LJ and Fernie AR (2006) Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiol* **142**:1380-1396.
- Carrari F and Fernie AR (2006) Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *J Exp Bot* **57**:1883-1897.
- Carrari F, Nunes-Nesi A, Gibon Y, Lytovchenko A, Loureiro ME and Fernie AR (2003) Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. *Plant Physiol* **133**:1322-1335.
- Cheniclet C, Rong WY, Causse M, Frangne N, Bolling L, Carde JP and Renaudin JP (2005) Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol* **139**:1984-1994.
- Chen D and Zhao J (2008) Free IAA in stigmas and styles during pollen germination and pollen tube growth of *Nicotiana tabacum*. *Physiol Plant* **134**:202-215.
- Colombo L, Franken J, Van der Krol AR, Wittich PE, Dons HJ and Angenent GC (1997) Downregulation of ovule-specific MADS box genes from petunia results in maternally controlled defects in seed development. *Plant Cell* **9**:703-715.

- Cowherd S, Espina V, Petricoin Iii E and Liotta L (2004) Proteomic Analysis of Human Breast Cancer Tissue with Laser-Capture Microdissection and Reverse-Phase Protein Microarrays. *Clinical Breast Cancer* **5**:385-392
- Curtis MD and Grossniklaus U (2003) A Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* **133**:462-469.
- Curtis MD, Grossniklaus U, Brand L, Horler M, Nuesch E, Vassalli S, Barrell P, Yang W and Jefferson RA (2003) A versatile and reliable two-component system for tissue-specific gene induction in Arabidopsis. *Plant Physiol* **133**:462-469.
- D'Amato F (1964) Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. *Caryologia* **17**: 41-52.
- D'Aoust MA, Yelle S and Nguyen-Quoc B (1999) Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell* **11**:2407-2418.
- Davidovich-Rikanati R, Sitrit Y, Tadmor Y, Iijima Y, Bilenko N, Bar E, Carmona B, Fallik E, Dudai N, Simon JE, Pichersky E and Lewinsohn E (2007) Enrichment of tomato flavor by diversion of the early plastidial terpenoid pathway. *Nat Biotechnol* **25**:899-901.
- Davuluri GR, van Tuinen A, Fraser PD, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, Brummell DA, King SR, Palys J, Uhlig J, Bramley PM, Pennington HM and Bowler C (2005) Fruit-specific ARNi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nat Biotechnol* **23**:890-895.
- De Grauwe L, Chaerle L, Dugardeyn J, Decat J, Rieu I, Vriezen WH, Baghour M, Moritz T, Beemster GT, Phillips AL, Harberd NP, Hedden P and Van Der Straeten D (2008) Reduced gibberellin response affects ethylene biosynthesis and responsiveness in the Arabidopsis gai eto2-1 double mutant. *New Phytol* **177**:128-141.
- Deikman J, Kline R and Fischer RL (1992) Organization of ripening and ethylene regulatory regions in a fruit-specific promoter from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiology* **100**:2013-2017.
- de Jong M, Wolters-Arts M, Feron R, Mariani C and Vriezen WH (2009) The Solanum lycopersicum auxin response factor 7 (SIARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *Plant J* **57**:160-170.
- Dellapenna D, Kates DS and Bennett AB (1987) Polygalacturonase Gene Expression in Rutgers, rin, nor, and Nr Tomato Fruits. *Plant Physiol* **85**:502-507.
- Dill A and Sun T (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **159**:777-785.
- Dobbin K, Shih JH and Simon R (2003) Questions and answers on design of dual-label microarrays for identifying differentially expressed genes. *J Natl Cancer Inst* **95**:1362-1369.
- Dubin MJ, Bowler C and Benvenuto G (2008) A modified Gateway cloning strategy for overexpressing tagged proteins in plants. *Plant Methods* **4**:3.
- Eckardt NA (2007) Gibberellins are modified by methylation in planta. *Plant Cell* **19**:3-6.
- Elliott KJ, Butler WO, Dickinson CD, Konno Y, Vedvick TS, Fitzmaurice L and Mirkov TE (1993) Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from 2 tomato species and temporal differences in messenger arn levels during fruit ripening. *Plant Molecular Biology* **21**:515-524.
- Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Rios G, Roig L and Moreno V (2003) The ploidy level of transgenic plants in Agrobacterium-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent (vol 106, pg 231, 2003). *Theor Appl Genet* **107**:190-190.
- Farrar J, Pollock C and Gallagher J (2000) Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Sci* **154**:1-11.
- Fernandez AI, Viron N, Alhaghdow M, Karimi M, Jones M, Amsellem Z, Sicard A, Czerednik A, Angenent G, Grierson D, May S, Seymour G, Eshed Y, Lemaire-Chamley M, Rothan C and Hilson P (2009) Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. *Plant Physiol*.
- Ficcadenti N, Sestili S, Pandolfini T, Cirillo C, Rotino GL and Spena A (1999) Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Molecular Breeding* **5**:463-470.
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Twyman RM (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol* **7**:152-158.
- Fos M, Nuez F and Garcia-Martinez JL (2000) The gene pat-2, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol* **122**:471-480.
- Fos M, Proano K, Nuez F and Garcia-Martinez JL (2001) Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system pat-3/pat-4 in tomato. *Physiol Plant* **111**:545-550.
- Frigerio M, Alabadi D, Perez-Gomez J, Garcia-Carcel L, Phillips AL, Hedden P and Blazquez MA (2006) Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **142**:553-563.
- Fu X and Harberd NP (2003) Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**:740-743.
- Galbraith DW, Harkins KR and Knapp S (1991) Systemic Endopolyploidy in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* **96**:985-989.
- García Martínez JL, Carbonell J (1980) Fruit-set of unpollinated ovaries of Pisum sativum L. Influence of plant growth regulators. *Planta* **147**: 451-456.
- Gillaspy G, Ben-David H and Gruissem W (1993) Fruits: A Developmental Perspective. *Plant Cell* **5**:1439-1451.
- Giovannoni J (2001) Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**:725-749.
- Giovannoni JJ (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Curr Opin Plant Biol* **10**:283-289.
- Godt DE and Roitsch T (1997) Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiol* **115**:273-282.
- Goetz M, Hooper LC, Johnson SD, Rodrigues JC, Vivian-Smith A and Koltunow AM (2007) Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato. *Plant Physiol* **145**:351-366.
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD and Koltunow AM (2006) AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**:1873-1886.
- Gorguet B, Eggink PM, Ocana J, Tiwari A, Schipper D, Finkers R, Visser RG and van Heusden AW (2008) Mapping and characterization of novel parthenocarpy QTLs in tomato. *Theor Appl Genet* **116**:755-767.
- Goyal K, Walton LJ and Tunnacliffe A (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* **388**:151-157.

- Hartley JL, Temple GF and Brasch MA (2000) ADN cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**:1788-1795.
- Hartweck LM (2008) Gibberellin signaling. *Planta* **229**:1-13.
- Hedden P and Kamiya Y (1997) GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**:431-460.
- Hedden P and Phillips AL (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* **5**:523-530.
- Hedden P and Proebsting WM (1999) Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* **119**:365-370.
- Henriksson E, Olsson AS, Johannesson H, Johansson H, Hanson J, Engstrom P and Soderman E (2005) Homeodomain leucine zipper class I genes in Arabidopsis. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiol* **139**:509-518.
- Huang H, Tudor M, Weiss CA, Hu Y and Ma H (1995) The Arabidopsis MADS-box gene AGL3 is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Plant Mol Biol* **28**:549-567.
- Iyer-Pascuzzi A, Simpson J, Herrera-Estrella L and Benfey PN (2009) Functional genomics of root growth and development in Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol* **12**:165-171.
- Jaime FMG, Enriqueta M, Marcos JCA and Cathie M (1998) Two bZIP proteins from Antirrhinum flowers preferentially bind a hybrid C-box/G-box motif and help to define a new sub-family of bZIP transcription factors. *The Plant Journal* **13**:489-505.
- Jacobsen E and Schouten HJ (2007) Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends Biotechnol* **25**:219-223.
- Jani D, Meena LS, Rizwan-ul-Haw QM, Singh Y, Sharma AK and Tyagi AK (2002) Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Research* **11**:447-454.
- Jefferson RA (1987) Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System. *Plant Molecular Biology Reporter* **5**:387-405.
- Joubes J, Phan TH, Just D, Rothan C, Bergounioux C, Raymond P and Chevalier C (1999) Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase A during the early development of tomato fruit. *Plant Physiol* **121**:857-869.
- Kapila J, De Rycke R, Vanmontagu M and Angenon G (1997) An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**: 101-108.
- Karimi M, Bleys A, Vanderhaeghen R and Hilson P (2007) Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiology* **145**:1183-1191.
- Karimi M, Inze D and Depicker A (2002) GATEWAY(TM) vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**:193-195.
- Karkonen A, Murigneux A, Martinant JP, Pepey E, Tatout C, Dudley BJ and Fry SC (2005) UDP-glucose dehydrogenases of maize: a role in cell wall pentose biosynthesis. *Biochem J* **391**:409-415.
- Kerk NM, Ceserani T, Tausta SL, Sussex IM and Nelson TM (2003) Laser Capture Microdissection of Cells from Plant Tissues. *Plant Physiol* **132**:27-35.
- Klann EM, Hall B and Bennett AB (1996) Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiol* **112**:1321-1330.
- Kneissl ML and Deikman J (1996) The Tomato E8 Gene Influences Ethylene Biosynthesis in Fruit but Not in Flowers. *Plant Physiol* **112**:537-547.
- Koch K (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* **7**:235-246.
- Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP and Peng J (2002) Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev* **16**:646-658.
- Lemaire-Chamley M, Petit J, Garcia V, Just D, Baldet P, Germain V, Fagard M, Mouassite M, Cheniclet C and Rothan C (2005) Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiol* **139**:750-769.
- Llop-Tous I, Barry CS and Grierson D (2000) Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. *Plant Physiol* **123**:971-978.
- Lockhart DJ and Winzler EA (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**:827-836.
- Ma Y, Lin SQ, Gao Y, Li M, Luo WX, Zhang J and Xia NS (2003) Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity of expression products. *World JOURNAL of Gastroenterology* **9**:2211-2215.
- Marillonnet S, Thoeninger C, Kandzia R, Klimyuk V and Gleba Y (2005) Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* **23**:718-723.
- Marti C, Orzaez D, Ellul P, Moreno V, Carbonell J and Granell A (2007) Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant J* **52**:865-876.
- Martin DN, Proebsting WM and Hedden P (1997) Mendel's dwarfing gene: cADNs from the Le alleles and function of the expressed proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:8907-8911.
- Mehta RA, Cassol T, Li N, Ali N, Handa AK and Mattoo AK (2002) Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nature Biotechnology* **20**:613-618.
- Miron D, Petreikov M, Carmi N, Shen S, Levin I, Granot D, Zamski E and Schaffer AA (2002) Sucrose uptake, invertase localization and gene expression in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* and the sucrose-accumulating *Lycopersicon hirsutum*. *Physiol Plant* **115**:35-47.
- Miron D and Schaffer AA (1991) Sucrose Phosphate Synthase, Sucrose Synthase, and Invertase Activities in Developing Fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill. and the Sucrose Accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb. and Bonpl. *Plant Physiol* **95**:623-627.
- Montgomery J, Pollard V, Deikman J and Fischer RL (1993) Positive and negative regulatory regions control the spatial distribution of polygalacturonase transcription in tomato fruit pericarp. *Plant Cell* **5**:1049-1062.
- Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, De Vos CHR, van Tunen AJ and Verhoeven ME (2001) Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnology* **19**:470-474.
- Mueller LA, Tanksley SD, Giovannoni JJ, van Eck J, Stack S, Choi D, Kim BD, Chen M, Cheng Z, Li C, Ling H, Xue Y, Seymour G, Bishop G, Bryan G, Sharma R, Khurana J, Tyagi A, Chattopadhyay D, Singh NK, Stiekema W, Lindhout P, Jesse T, Lankhorst RK, Bouzayen M, Shibata D, Tabata S, Granell A, Botella MA, Giuliano G,

- Frusciante L, Causse M and Zamir D (2005) The Tomato Sequencing Project, the First Cornerstone of the International Solanaceae Project (SOL). *Comp Funct Genomics* **6**:153-158.
- Nakazono M, Qiu F, Borsuk LA and Schnable PS (2003) Laser-Capture Microdissection, a Tool for the Global Analysis of Gene Expression in Specific Plant Cell Types: Identification of Genes Expressed Differentially in Epidermal Cells or Vascular Tissues of Maize. *Plant Cell* **15**:583-596.
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lison P, Nemri A, Harberd NP and Jones JD (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* **18**:650-655.
- Nguyen-Quoc B and Foyer CH (2001) A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *J Exp Bot* **52**:881-889.
- Nicholass FJ, Smith CJS, Schuch W, Bird CR and Grierson D (1995) High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions. *Plant Molecular Biology* **28**:423-435.
- Nitsch LM, Oplaat C, Feron R, Ma Q, Wolters-Arts M, Hedden P, Mariani C and Vriezen WH (2009) Abscisic acid levels in tomato ovaries are regulated by LeNCED1 and SICYP707A1. *Planta* **229**:1335-1346.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Lytovchenko A, Smith AM, Loureiro ME, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ and Fernie AR (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol* **137**:611-622.
- Oono Y, Chen QG, Overvoorde PJ, Kohler C and Theologis A (1998) age Mutants of Arabidopsis exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* **10**:1649-1662.
- Orzaez D, Mirabel S, Wieland WH and Granell A (2006) Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol* **140**:3-11.
- Ossowski S, Schwab R and Weigel D (2008) Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J* **53**:674-690.
- Ozga JA and Reinecke DM (2003) Hormonal Interactions in Fruit Development. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**:73-81.
- Pandolfini T, Rotino GL, Camerini S, Defez R and Spena A (2002) Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotechnol* **2**:1.
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NE, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE and Hedden P (1995) Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cADN clones from Arabidopsis. *Plant Physiol* **108**:1049-1057.
- Prisic S and Peters RJ (2007) Synergistic substrate inhibition of ent-copalyl diphosphate synthase: a potential feed-forward inhibition mechanism limiting gibberellin metabolism. *Plant Physiol* **144**:445-454.
- Proels RK, Hause B, Berger S and Roitsch T (2003) Novel mode of hormone induction of tandem tomato invertase genes in floral tissues. *Plant Mol Biol* **52**:191-201.
- Ramirez YJP, Tasciotti E, Gutierrez-Ortega A, Torres AJD, Flores MTO, Giacca M and Lim MAG (2007) Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 Tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice. *Clinical and Vaccine Immunology* **14**:685-692.
- Rausch T and Greiner S (2004) Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim Biophys Acta* **1696**:253-261.
- Reca IB, Brutus A, D'Avino R, Villard C, Bellincampi D and Giardina T (2008) Molecular cloning, expression and characterization of a novel apoplastic invertase inhibitor from tomato (*Solanum lycopersicum*) and its use to purify a vacuolar invertase. *Biochimie* **90**:1611-1623.
- Richards DE, King KE, Ait-Ali T and Harberd NP (2001) How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**:67-88.
- Roessner-Tunali U, Hegemann B, Lytovchenko A, Carrari F, Bruedigam C, Granot D and Fernie AR (2003) Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiol* **133**:84-99.
- Roitsch T and Gonzalez MC (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci* **9**:606-613.
- Rojo E, Zouhar J, Carter C, Kovaleva V and Raikhel NV (2003) A unique mechanism for protein processing and degradation in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:7389-7394.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E and Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**:675-709.
- Rotino GL, Perri E, Zottini M, Sommer H and Spena A (1997) Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nat Biotechnol* **15**:1398-1401.
- Roy PJ, Stuart JM, Lund J and Kim SK (2002) Chromosomal clustering of muscle-expressed genes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **418**:975-979.
- Ruzin SE (1999) *Plant microtechnique and microscopy*. New York:Oxford University Press.
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M and Matsuoka M (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* **134**:1642-1653.
- Sala F, Manuela Rigano M, Barbante A, Basso B, Walmsley AM and Castiglione S (2003) Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* **21**:803-808.
- Sandelin A, Wasserman WW and Lenhard B (2004) ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucl Acids Res* **32**:W249-252.
- Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS, Osadjan MD and Buetow DE (2000) Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res* **9**:127-135.
- Santiago J, Rodrigues A, Saez A, Rubio S, Antoni R, Dupeux F, Park SY, Marquez JA, Cutler SR and Rodriguez PL (2009) Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *Plant J* **60**:575-588.
- Schauer N, Zamir D and Fernie AR (2005) Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *J Exp Bot* **56**:297-307.
- Schijlen EG, de Vos CH, Martens S, Jonker HH, Rosin FM, Molthoff JW, Tikunov YM, Angenent GC, van Tunen AJ and Bovy AG (2007) ARN interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiol* **144**:1520-1530.
- Scott IM (1990) Plant hormone response mutants. *Physiologia Plantarum* **78**:147-152.

- Serrani JC, Sanjuan R, Ruiz-Rivero O, Fos M and Garcia-Martinez JL (2007) Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiol* **145**:246-257.
- Serrani JC, Ruiz-Rivero O, Fos M and Garcia-Martinez JL (2008) Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *Plant J* **56**:922-934.
- Silhavy D, Molnar A, Luciola A, Szittya G, Hornyik C, Tavazza M and Burgyan J (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* **21**:3070-3080.
- Sitbon F, Hennion S, Sundberg B, Little CH, Olsson O and Sandberg G (1992) Transgenic Tobacco Plants Coexpressing the *Agrobacterium tumefaciens* *iaaM* and *iaaH* Genes Display Altered Growth and Indoleacetic Acid Metabolism. *Plant Physiol* **99**:1062-1069.
- Smirnov N and Grant M (2008) Plant biology: do DELLAs do defence? *Curr Biol* **18**:R617-619.
- Srivastava A and Handa A (2005) Hormonal Regulation of Tomato Fruit Development: A Molecular Perspective. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**:67-82.
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Dolezal K, Schlereth A, Jurgens G and Alonso JM (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**:177-191.
- Stuj V, Bangerth F (1982) Induced parthenocarpy – a way of changing the levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill). 1. Extractable hormones. *Plant Growth Regul* **1**:243-250.
- Takayuki A, Takehiro M, Hiroaki K, Shoshi K, Akihiro K, Hiroaki S and Koh-ichi K (2002) Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. *The Plant Journal* **32**:401-408.
- Tanaka N, Matsuoka M, Kitano H, Asano T, Kaku H and Komatsu S (2006) *gid1*, a gibberellin-insensitive dwarf mutant, shows altered regulation of probenazole-inducible protein (PBZ1) in response to cold stress and pathogen attack. *Plant Cell Environ* **29**:619-631.
- Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng Y, Lim J, Zhao Y, Ballare CL, Sandberg G, Noel JP and Chory J (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**:164-176.
- Taylor MA, Arif SAM, Kumar A, Davies HV, Scobie LA, Pearce SR and Flavell AJ (1992) Expression and Sequence-Analysis of CADNs Induced During the Early Stages of Tuberization in Different Organs of the Potato Plant (*Solanum-Tuberosum* L). *Plant Molecular Biology* **20**:641-651.
- Thomas SG, Phillips AL and Hedden P (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2- oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:4698-4703.
- Thomas SG and Sun TP (2004) Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiol* **135**:668-676.
- Thomas SG, Rieu I and Steber CM (2005) Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam Horm* **72**:289-338.
- Trouverie J, Chateau-Joubert S, Thevenot C, Jacquemot MP and Prioul JL (2004) Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. *Planta* **219**:894-905.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P and Fischer R (2003) Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* **21**:570-578.
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Motoyuki A and Matsuoka M (2007) Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **58**:183-198.
- Urbanczyk-Wocniak E, Luedemann A, Kopka J, Selbig J, Roessner-Tunali U, Willmitzer L and Fernie AR (2003) Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology. *EMBO Rep* **4**:989-993.
- Van Haaren MJ and Houck CM (1993) A functional map of the fruit-specific promoter of the tomato 2A11 gene. *Plant Mol Biol* **21**:625-640.
- Vanhaaren MJJ and Houck CM (1993) A Functional Map of the Fruit-Specific Promoter of the Tomato 2a11-Gene. *Plant Molecular Biology* **21**:625-640.
- van Loon LC, Rep M and Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**:135-162.
- Voinnet O (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* **17**:449-459.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P and Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* **33**:949-956.
- Vriezen WH, Feron R, Maretto F, Keijman J and Mariani C (2008) Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytol* **177**:60-76.
- Walmsley AM, Alvarez ML, Jin Y, Kirk DD, Lee SM, Pinkhasov J, Rigano MM, Arntzen CJ and Mason HS (2003) Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato. *Plant Cell Reports* **21**:1020-1026.
- Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latche A, Pech JC and Bouzayen M (2005) The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* **17**:2676-2692.
- Wang H, Schauer N, Usadel B, Frasse P, Zouine M, Hernould M, Latche A, Pech JC, Fernie AR and Bouzayen M (2009) Regulatory Features Underlying Pollination-Dependent and -Independent Tomato Fruit Set Revealed by Transcript and Primary Metabolite Profiling. *Plant Cell*.
- Waterhouse PM and Helliwell CA (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* **4**:29-38.
- Waterhouse PM, Wang MB and Lough T (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**:834-842.
- Weiss D and Ori N (2007) Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiol* **144**:1240-1246.
- Wen CK and Chang C (2002) *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* **14**:87-100.
- West AG, Causier BE, Davies B and Sharrocks AD (1998) DNA binding and dimerisation determinants of Antirrhinum majus MADS-box transcription factors. *Nucleic Acids Res* **26**:5277-5287.
- Wielopolska A, Townley H, Moore I, Waterhouse P and Helliwell C (2005) A high-throughput inducible ARNi vector for plants. *Plant Biotechnol J* **3**:583-590.
- Williams LE, Lemoine R and Sauer N (2000) Sugar transporters in higher plants--a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci* **5**:283-290.

## *Bibliografía*

- Woodward AW and Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot (Lond)* **95**:707-735.
- Wroblewski T, Tomczak A and Michelmore R (2005) Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnol J* **3**:259-273.
- Yamaguchi S and Kamiya Y (2000) Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol* **41**:251-257.
- Yamamoto N, Tsugane T, Watanabe M, Yano K, Maeda F, Kuwata C, Torki M, Ban Y, Nishimura S and 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 YH and Speed T (2002) Design issues for cADN microarray experiments. *Nat Rev Genet* **3**:579-588.
- Yongquan L, Jingli C, Ying L, Haipeng X, Francis JC, Robert PW and Mahendra R (2002) Microarray analysis of selected genes in neural stem and progenitor cells. *Journal of Neurochemistry* **83**:1481-1497.
- Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK and Mason HS (2006) Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol J* **4**:419-432.