



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



TESIS DOCTORAL

**Identificación y caracterización de mutantes de
tomate relacionados con el cuajado dependiente e
independiente de polinización**

CARLOS RIBELLES ALFONSO
Septiembre, 2018

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

El Dr. BENITO JOSÉ PINEDA CHAZA y el Dr. VICENTE MORENO FERRERO, profesores del área de Genética del Departamento de Biotecnología (Universitat Politècnica de València),

HACEN CONSTAR:

Que D. Carlos Ribelles Alfonso, Ingeniero Técnico Agrícola y Licenciado en Ciencias Ambientales, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que, con el título "Identificación y caracterización de mutantes de tomate relacionados con el cuajado dependiente e independiente de polinización", presenta para optar al grado de Doctor por la Universitat Politècnica de València.

Para que así conste a los efectos académicos oportunos, firman el presente en Valencia, a de de 2018.

DR. D. BENITO JOSÉ PINEDA CHAZA

DR. D. VICENTE MORENO FERRERO

GRACIAS

Después de todos estos años, miro hacia atrás y me sorprendo de haber llegado hasta aquí. Por suerte, he contado con muchas personas que de un modo u otro han contribuido a que éste trabajo sea hoy en día una realidad.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores la confianza depositada en mí, a Vicente Moreno, gracias por la oportunidad que me brindaste al poder realizar la tesis doctoral en un grupo de investigación tan consolidado como éste, y no solo eso, gracias por estar ahí cuando más lo necesitaba, nunca olvidaré todos aquellos consejos que me diste mientras tomábamos un café durante mi estancia en Almería. También recordaré siempre, aunque sin tanta nostalgia, aquel paseíto “light” de seis horas y media por la montaña para “descargar” las piernas. A Benito Pineda, no tengo palabras para agradecerte todo lo que he aprendido a tu lado, sin tu ayuda hubiera sido imposible conseguirlo, gracias por enseñarme tanto, desde las cosas más básicas hasta aquellas segregaciones mendelianas que a día de hoy todavía se escapan a mi conocimiento, y por último, gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme y por tantos buenos momentos que hemos pasado juntos que nunca olvidaré.

A mi compañera y amiga Begoña García, es increíble la cantidad de cosas que he aprendido de cultivo *in vitro* a tu lado, gracias por hacer mi día a día tan llevadero y enseñarme a disfrutar tanto de mi trabajo, desde lo más rutinario como la preparación de los medios de cultivo hasta los complejos aislamientos de microsporas. Creo que ambos no esperábamos formar tan gran equipo. Tampoco me podría olvidar de mi mentora y amiga Teresa Antón, la persona que me ayudó a dar mis primeros pasos en el mundo del cultivo *in vitro*.

A Alejandro Atarés y Marybel Jáquez, por vuestra amistad y por estar siempre ahí, tanto dentro como fuera del laboratorio, el poder contar con vosotros a cada instante me ha permitido que este trabajo haya sido un poco más fácil.

A Marisol Gascón del servicio de microscopía del IBMCP, gracias por tu infinita paciencia enseñándome a manejar los distintos equipos, he disfrutado mucho aprendiendo algo nuevo cada día.

Quiero agradecer también a Rafael Lozano el trato recibido durante mi estancia en su laboratorio, gracias a Fernando Yuste, Juan, Toñi, Laura, Sandra, Jorge, Ana, Rocío, Fernando Pérez y Carmen, por ayudarme a comprender un poco mejor la biología molecular y por hacerme sentir como en casa.

A Jesús Romero, por su gran colaboración y dedicación en las tareas de invernadero. Tampoco podría olvidarme de Montse y Javi del departamento de genética, gracias por el excelente trato recibido a diario y por su gran ayuda durante todos estos años.

También quisiera agradecer a Sergio González del departamento de Biología Vegetal su implicación y gran ayuda en un trabajo tan novedoso para mí como fue la medición de las distintas clorofilas, aunque bien es verdad que sin la ayuda de Manuel Sánchez, que en paz descansa, estos experimentos hubieran resultado más difíciles de llevarlos a cabo.

A mis compañeros y amigos Jorge y Sibilla, que pese a que ya no estén con nosotros en el laboratorio, han sido muchos y muy buenos los momentos que hemos pasado juntos durante todos estos años.

También quisiera dar las gracias a José María Seguí del grupo de Biología Celular por darme la oportunidad de poder trabajar y aprender distintas técnicas que han sido de gran utilidad para el desarrollo de este trabajo. A mi compañero de carrera y amigo Alberto Galán, gracias por tu ayuda con los distintos tipos de tinción de polen, ha sido un placer poder compartir tantos buenos momentos contigo.

Me gustaría agradecer también a toda mi familia el apoyo recibido, especialmente a mis padres, mis hermanos y mis abuelos, gracias por estar siempre a mi lado, tanto en los buenos como en los malos momentos, me habéis ayudado muchísimo todos estos años, no lo olvidaré nunca, os debo mucho, mil gracias.

Y por último, pero no menos importante, un especial agradecimiento a Sandra, quien ha puesto un poco de su arte en este trabajo y quien ha compartido conmigo los días más duros y también los más felices, gracias por tus continuas frases de apoyo y por tu ayuda incondicional durante todos estos años, gracias por todo, te quiero.

SAM	<i>Shoot Apical Meristem</i>
RAM	<i>Root Apical Meristem</i>
FA	<i>FALSIFLORA</i>
LFY	<i>LEAFY</i>
SFT	<i>SINGLE FLOWER TRUSS</i>
FT	<i>FLOWERING LOCUS T</i>
AN	<i>ANANTHA</i>
UFO	<i>UNUSUAL FLORAL ORGANS</i>
J	<i>JOINTLESS</i>
SVP	<i>SHORT VEGETATIVE PHASE</i>
AGL24	<i>AGAMOUS LIKE 24</i>
MC	<i>MACROCALYX</i>
AP1	<i>APETALA1</i>
FUL	<i>FRUITFULL</i>
UF	<i>UNIFLORA</i>
BL	<i>BLIND</i>
TAG1	<i>TOMATO AGAMOUS 1</i>
TAGL11	<i>TOMATO AGAMOUS LIKE 11</i>
sl	<i>stamenless</i>
cl	<i>corollaless</i>
DEF	<i>DEFICIENS</i>
AG	<i>AGAMOUS</i>
GAs	<i>Giberelinas</i>
WT	<i>Wild-type</i>
PMC	<i>Pollen Mother Cells</i>
PMI	<i>Pollen Mitosis I</i>
ps	<i>positional sterile</i>
pmcd1	<i>pre-meiotic cytokinesis defect 1</i>
WUS	<i>WUSCHEL</i>
STM	<i>SHOOTMERISTEMLESS</i>
KNU	<i>KNULES</i>
CLV	<i>CLAVATA</i>
IMA	<i>INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY</i>
eno	<i>excessive number of organ</i>
SHP1	<i>SHATTERPROOF1</i>
STK	<i>SEEDSTICK</i>

ALQ	<i>ARLEQUÍN</i>
SPL/NZZ	<i>SPOROCYTELESS/NOZZLE</i>
ARF	<i>Auxin Response Factor</i>
FWF	<i>ARF8/FRUIT WITHOUT FERTILIZATION</i>
AUCSIA	<i>AUxin Cum Silencing Action</i>
ABF	<i>Auxin-binding f-box protein</i>
CHS	<i>chalcona sintasa</i>
SCF	Skp1/cullin/F-box
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>
Nr	<i>Never-ripe</i>
ERF	Ethylene Response Factor
rin	ripening-inhibitor
nor	nonripening
Cnr	<i>Colorless nonripening</i>
SPBP	<i>SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN</i>
MG	Medio de germinación
BF	Botón Floral
CLV	<i>CLAVATA</i>
TTC	<i>2,3,5-triphenil tetrazolium chloride</i>
FDA	Diacetato de Fluoresceína
DAPI	<i>4,6-diamino-2-2phenylindole</i>
JA	Ácido Jasmónico
SA	Ácido Salicílico
IAA	Ácido indol-3-acético
ABA	Ácido abscísico
DHZ	Dihidrozeatina
iP	isopenteniladenina
tZ	transzeatina
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
MEP	2-C-metil-D-eritritol-4 fosfato
Km	Kanamicina
pb	Pares de bases
AD	<i>Anthesis Day</i>
LS	<i>LATERAL SUPPRESSOR</i>
IND	INDEHISCENT

Índice general

Índice	I
Índice de figuras	V
Índice de tablas	IX
Resúmenes	XI

Índice

1. Introducción	1
1.1. El desarrollo reproductivo en tomate: floración.....	1
1.1.1. Transición a la floración.....	1
1.1.2. Especificación de la identidad de los órganos florales.....	3
1.1.3. Desarrollo de la anteras y del gametofito masculino.....	5
1.1.3.1. Componentes genéticos relacionados con el desarrollo de las anteras.....	5
1.1.3.2. Componentes genéticos relacionados con el desarrollo del polen.....	7
1.1.4. Desarrollo de los ovarios y del gametofito femenino.....	11
1.2. El proceso reproductivo en tomate: fructificación.....	14
1.2.1. El proceso de polinización y fertilización.....	14
1.2.2. Fases del desarrollo del fruto.....	16
1.2.3. Componentes genéticos y hormonales relacionados con la transición de ovario a fruto.....	19
1.2.3.1. Papel de las auxinas en el cuajado del fruto.....	20
1.2.3.2. Papel de las giberelinas en el cuajado de fruto.....	25

1.2.3.3. Papel de las citoquininas en el cuajado de fruto.....	28
1.2.3.4. Integración de los diferentes componentes implicados en el cuajado del fruto.....	29
1.2.3.5. Quinasas dependientes de ciclina y cuajado del fruto.....	31
1.2.4. Componentes genéticos y hormonales relacionados con la maduración del fruto.....	33
1.2.4.1. Regulación de la síntesis de etileno durante el desarrollo del fruto.....	33
1.2.4.2. La ruta de señalización de etileno en tomate.....	34
1.2.4.3. Los sistemas 1 y 2 que conducen a la transición de la maduración.....	37
1.2.4.4. Control transcripcional de la maduración del fruto.....	37
2. Antecedentes y Objetivos.....	43
3. Materiales y Métodos.....	47
3.1. Material vegetal.....	47
3.2. Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i>	47
3.2.1. Esterilización de las semillas.....	47
3.2.2. Germinación y obtención de plántulas axénicas.....	48
3.2.3. Cultivo de explantes primarios.....	48
3.2.4. Inducción de organogénesis.....	48
3.2.5. Enraizamiento de brotes y propagación clonal de las plantas.....	49
3.2.6. Evaluación del desarrollo radicular <i>in vitro</i>	49
3.2.7. Evaluación <i>in vitro</i> de la tolerancia a estrés hídrico.....	49
3.2.8. Análisis de la resistencia-sensibilidad a la kanamicina.....	50
3.3. Aclimatación y transplante.....	50
3.4. Obtención de progenies a partir de plantas mutantes.....	51
3.5. Análisis genético de líneas T-DNA y determinación de co-segregación.....	51
3.6. Caracterización de líneas T-DNA.....	51
3.6.1. Caracterización del desarrollo reproductivo.....	52
3.6.1.a. Caracterización de flores: estadios del desarrollo floral.....	52
3.6.1.b. Evaluación del tamaño del ovario.....	53
3.6.1.c. Análisis de la viabilidad de los granos de polen.....	53

3.6.1.d. Análisis histológicos.....	54
3.7. Injertos.....	55
3.8. Emasculación de flores.....	56
3.9. Evaluación de la producción.....	56
3.10. Cuantificación endógena de hormonas.....	56
3.11. Análisis de expresión de genes mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	57
3.12. Tratamiento estadístico de los datos.....	58
4. Resultados.....	59
4.1. <i>Lower fruit setting 2084 (Lsf2084)</i> : comentarios previos.....	59
4.1.1. Caracterización del mutante <i>Lfs2084</i>	60
4.1.2. Identificación de un inserto responsable del fenotipo mutante.....	63
4.1.3. Pruebas de viabilidad de polen <i>in vitro</i> y análisis de histología en flores.....	67
4.1.4. Análisis de viabilidad de polen <i>in vivo</i>	69
4.1.5. Contenido endógeno de algunas hormonas en el mutante <i>Lfs2084</i>	74
4.1.6. Expresión de genes implicados en el cuajado de fruto.....	75
4.2. <i>Lower fruit setting 2448 (Lsf2448)</i> : comentarios previos.....	77
4.2.1. Caracterización del mutante <i>Lfs2448</i>	77
4.2.2. Caracterización de progenies procedentes de autofecundación del mutante <i>Lfs2448</i>	79
4.2.3. Pruebas de viabilidad de polen <i>in vitro</i> y análisis histológicos en flores.....	81
4.2.4. Análisis de viabilidad de polen <i>in vivo</i>	85
4.2.5. Caracterización molecular de la mutación <i>Lfs2448</i>	86
4.3. <i>Arlequín</i> : antecedentes.....	89
4.3.1. La expresión ectópica de <i>ALQ</i> altera el patrón de crecimiento vegetativo.....	90
4.3.2. Evaluación de la tasa de cuajado del mutante <i>Alq</i>	99
4.3.3. El mutante <i>Alq</i> exhibe partenocarpia facultativa.....	100
4.3.4. Los ovarios del mutante <i>Alq</i> experimentan cuajado prematuro.....	103
4.3.5. Expresión de genes implicados en el cuajado de fruto.....	106

4.3.6. Contenido endógeno de hormonas en ovarios del mutante <i>Alq</i>	113
4.3.7. Cuajado de fruto en plantas con menores niveles del gen <i>ALQ</i>	115
4.3.8. Cuajado de fruto del mutante <i>Alq</i> en condiciones de moderada salinidad.....	116
5. Discusión	121
5.1. Los mutantes <i>Lfs2084</i> y <i>Lfs2448</i> exhiben menor tasa de cuajado de fruto.....	121
5.2. Las mutaciones <i>Lfs2084</i> y <i>Lfs2448</i> conducen a letalidad del gameto masculino.....	122
5.3. La mutación <i>Lfs2084</i> altera la ruta MEP.....	124
5.4. La mutación <i>Lfs2084</i> altera la expresión de genes implicados en el cuajado.....	129
5.5. El menor cuajado de fruto en el mutante <i>Lfs2448</i> está relacionado con la alteración de citocromos P450 (CYP450).....	131
5.6. La mutación <i>Alq</i> tiene efectos sobre el crecimiento vegetativo.....	133
5.7. La mutación <i>Alq</i> promueve cambios en la configuración espacial del sistema radicular.....	135
5.8. La mutación <i>Alq</i> conduce a un mayor cuajado de fruto.....	136
5.8.1. La mayor tasa de cuajado se debe a un cuajado prematuro del fruto.....	137
5.8.2. El cuajado prematuro del fruto parece estar relacionado con la mayor expresión de genes implicados en el ciclo celular.....	138
5.8.3. La mayor concentración endógena de citoquininas en los ovarios conduce a un cuajado prematuro del fruto en el mutante <i>Alq</i>	139
5.8.4. El cuajado de fruto es menor en plantas que tienen silenciado el gen <i>ALQ</i>	140
5.9. El mutante <i>Alq</i> mantiene la producción de fruto en condiciones de moderada salinidad.....	141
6. Conclusiones	143
7. Bibliografía	145

Índice de figuras

Figura 1	A) Meristemo apical de tallo y B) meristemas florales en diferentes estadios de desarrollo.....	2
Figura 2	El modelo del cuarteto floral y determinación de la identidad de los órganos florales a través de genes de función ABCDE.....	4
Figura 3	Eventos citológicos relacionados con la especificación de las células germinales masculinas a partir del estadio de tétrada en Arabidopsis.....	8
Figura 4	Eventos citológicos relacionados con la especificación de las células germinales femeninas en Arabidopsis.....	15
Figura 5	Ilustración del proceso de polinización y fecundación en plantas superiores.....	16
Figura 6	Secciones transversales de un ovario (A) y un fruto (B) de tomate.....	17
Figura 7	Cuajado y desarrollo del fruto de tomate.....	18
Figura 8	Mecanismo molecular de represión/activación de genes de respuesta a auxinas.....	21
Figura 9	Modelo aceptado como vía de regulación de los genes de respuesta a auxina por medio de proteínas ARFs y Aux/IAA	23
Figura 10	Modelo que propone que <i>ARF7</i> activaría la expresión de genes que reprimen la respuesta a auxinas y, por tanto, el cuajado de fruto.....	24
Figura 11	Esquema de las rutas de la no hidroxilación y de la hidroxilación en el C-13.....	26
Figura 12	Modelo sobre la regulación del desarrollo del fruto partenocárpico a través de las rutas de señalización hormonales.....	30
Figura 13	Factores de transcripción asociados al proceso de maduración que han evolucionado consecuencia de eventos de poliploidización para adquirir funciones diversas relacionadas con el desarrollo y maduración del fruto de tomate.....	41
Figura 14	Ensayo <i>in vitro</i> de viabilidad del polen en el WT y en el mutante <i>Lfs2084</i>	59
Figura 15	Evaluación de caracteres del desarrollo vegetativo en el WT y el mutante <i>Lfs2084</i>	61

Figura 16	Evaluación de caracteres del desarrollo reproductivo en el WT y el mutante <i>Lfs2084</i>	62
Figura 17	Ilustración simple de un ovario en el que los círculos blancos serían los óvulos y los amarillos los granos de polen.....	64
Figura 18	Cruzamientos entre una planta mutante con 1 inserto funcional y el WT.....	65
Figura 19	Inflorescencias y flores de plantas WT-Km ^S (A y C) y <i>Lfs2084-7</i> -Km ^R (B y D).....	66
Figura 20	Ensayo <i>in vitro</i> de viabilidad del polen en el WT y <i>Lfs2084-7</i>	67
Figura 21	Secciones longitudinales de sacos polínicos del WT y del mutante <i>Lfs2084-7</i> en estadios florales de pre-antesis y antesis.	68
Figura 22	Detalle de los óvulos del WT y del mutante <i>Lfs2084-7</i> en estadio de antesis.....	68
Figura 23	Detalle de los ovarios del WT y del mutante <i>Lfs2084-7</i> en los estadios de pre-antesis, antesis y 5 días post-antesis.....	69
Figura 24	Ensayo de viabilidad <i>in vivo</i> de polen WT en pistilos de flores WT.....	70
Figura 25	Ensayo de viabilidad <i>in vivo</i> de polen <i>Lfs2084-7</i> en pistilos de flores <i>Lfs2084-7</i>	71
Figura 26	Ensayo de viabilidad <i>in vivo</i> de polen WT en pistilos de flores <i>Lfs2084-7</i>	72
Figura 27	Ensayo de viabilidad <i>in vivo</i> de polen <i>Lfs2084-7</i> en pistilos de flores WT.....	73
Figura 28	Expresión relativa de los genes <i>SIGA2ox1</i> , <i>SIGA2ox2</i> , <i>SIARF7</i> y <i>TAG1</i> en ovarios del WT y del mutante <i>Lfs2084</i>	75
Figura 29	Caracteres del desarrollo reproductivo en el WT y el mutante <i>Lfs2448</i>	78
Figura 30	Autofecundación de una planta mutante con 1 inserto funcional.	80
Figura 31	Comparación entre la cantidad de polen extraído de una flor WT respecto al extraído a partir de dos flores <i>Lfs2448</i>	81
Figura 32	Análisis <i>in vitro</i> de viabilidad del polen con acetato de carmín en el WT y <i>Lfs2448</i>	82
Figura 33	Análisis <i>in vitro</i> de viabilidad del polen con FDA en el WT (A y B) y <i>Lfs2448</i> (C y D).....	82
Figura 34	Caracterización del desarrollo del polen mediante tinción con DAPI en el WT y el mutante <i>Lfs2448</i>	83

Figura 35	Desarrollo del polen mediante histología en el WT y el mutante <i>Lfs2448</i>	84
Figura 36	Detalle de los ovarios del WT y del mutante <i>Lfs2448</i> en estadio de antesis.....	85
Figura 37	Ensayo de viabilidad <i>in vivo</i> de polen a las 24 horas de la polinización.....	86
Figura 38	Representación esquemática de la localización genómica del inserto T-DNA en la línea mutante <i>Lfs2448</i>	86
Figura 39	Co-segregación entre el inserto de T-DNA y el fenotipo mutante <i>Lfs2448</i>	87
Figura 40	Portada de Plant and Cell Physiology.....	89
Figura 41	(A) Altura de plantas WT y <i>Alq</i> a lo largo del tiempo y B) Detalle de la altura de una planta WT (izda.) y <i>Alq</i> (dcha.) a los 29 días de la primera medición.....	91
Figura 42	Plantas WT y <i>Alq</i> tras 50 días de cultivo <i>in vitro</i>	92
Figura 43	(A) Número de raíces laterales que desarrollaron las plantas WT y <i>Alq</i> a los 6, 14, 30 y 37 días de la germinación y (B) Raíz de una planta WT (izda.) y de una planta <i>Alq</i> (dcha.) a los 14 días de la germinación.....	93
Figura 44	A) Plántulas WT (izda.) y <i>Alq</i> (dcha.) de 7 días y B) Plántulas WT (izda.) y <i>Alq</i> (dcha.) de 25 días	94
Figura 45	A) Altura de los injertos a lo largo del tiempo. B) Nivel de significación estadística.....	96
Figura 46	Plantas WT y <i>Alq</i> cultivadas en medio sin manitol (30 días) y en medio suplementado con 100 mM de manitol (60 días).....	97
Figura 47	Raíces de plantas WT (izda.) y <i>Alq</i> (dcha.) cultivadas en medio con manitol.....	98
Figura 48	Frutos de plantas WT y <i>Alq</i>	101
Figura 49	Ensayo <i>in vitro</i> de viabilidad del polen en el WT (A) y <i>Alq</i> (B).....	102
Figura 50	Comparación del desarrollo del ovario en el WT y <i>Alq</i> en los estadios del desarrollo floral de 5 días previos a la antesis, 2 días previos a la antesis y estadio de antesis.....	104
Figura 51	Secciones transversales de ovarios en estadio de antesis del WT (izda.) y de <i>Alq</i> (dcha.).....	105

Figura 52	A) Cuajado de un fruto <i>Alq</i> a partir de una flor previamente emasculada en preantesis y B) Detalle de un fruto obtenido a partir de una flor emasculada.....	106
Figura 53	Expresión relativa de <i>HYD/SISPL</i> en cálices (A) y ovarios (B) del WT y de <i>Alq</i> en estadios de pre-antesis, antesis y post-antesis.....	106
Figura 54	Expresión relativa de los genes <i>SIGA20ox1</i> , <i>SIGA20ox2</i> y <i>SIGA20ox3</i> en cálices (A, C y E) y ovarios (B, D y F) del WT y de <i>Alq</i> en estadios de pre-antesis, antesis y post-antesis.....	108
Figura 55	Expresión relativa de los genes <i>SIGA3ox1</i> , <i>SIGA3ox2</i> , <i>SIGA2ox1</i> y <i>SIGA2ox2</i> en cálices (A, C, E y G) y ovarios (B, D, F y H) del WT y de <i>Alq</i> en estadios de pre-antesis, antesis y post-antesis.....	109
Figura 56	Expresión relativa de los genes <i>SIIAA9</i> , <i>SIARF7</i> y <i>SIARF8</i> en cálices (A, C y E) y ovarios (B, D y F) del WT y de <i>Alq</i> en estadios de pre-antesis, antesis y post-antesis.....	110
Figura 57	Expresión relativa de los genes <i>TAG1</i> , <i>ALQ-TAGL1</i> y <i>TAGL6</i> en cálices (A, C y E) y ovarios (B, D y F) del WT y de <i>Alq</i> en estadios de pre-antesis, antesis y post-antesis.....	111
Figura 58	Expresión relativa de los genes <i>CycA1</i> y <i>CycD3</i> en cálices (A) y ovarios (B) del WT y de <i>Alq</i> en estadios de pre-antesis, antesis y post-antesis.....	112
Figura 59	Expresión relativa de los genes <i>CDKA1</i> y <i>SIWUS</i> en cálices (A) y ovarios (B) del WT y de <i>Alq</i> en estadios de pre-antesis, antesis y post-antesis.....	113
Figura 60	Nivel endógeno de diferentes hormonas en ovarios de plantas WT y <i>Alq</i> . El análisis se llevó a cabo en ovarios en los estadios de 5 días pre-antesis, 2 días pre-antesis y antesis.....	114
Figura 61	Porcentaje de frutos en cada planta por rango de pesos.....	118
Figura 62	Frutos en inflorescencias de plantas WT (A, C) y <i>Alq</i> (B, D) en ausencia de estrés salino.....	119
Figura 63	Ruta simplificada de la 2C-metil-eritrol 4-fosfato (MEP) en plantas que conduce a la síntesis de citoquininas, giberelinas y ácido abscísico (ABA), y contenido de algunas giberelinas de la ruta de la hidroxilación temprana en el C-13.....	127
Figura 64	Expresión relativa de <i>SIGA2ox2</i> en anteras del WT y <i>lfs2084</i> en estadios de pre-antesis, antesis y post-antesis.....	130

Índice de tablas

Tabla 1	Cebadores usados para las PCR cuantitativa a tiempo real y tamaño esperado del amplicón (pb).....	58
Tabla 2	Análisis genético del mutante <i>Lfs2084</i>	60
Tabla 3	Flores y frutos por inflorescencia, y tasa de cuajado en plantas WT y <i>Lfs2084</i>	62
Tabla 4	Resistencia o sensibilidad a la kanamicina (Km) en progenies de cruzamientos entre plantas mutantes y el WT.....	63
Tabla 5	Caracterización del fenotipo de las plantas procedentes de los cruzamientos entre el WT y el mutante <i>Lfs2084-7</i>	66
Tabla 6	Contenido endógeno de ácido abscísico (ABA), jasmónico (JA), indolacético (IAA), giberelinas activas (GA1 y GA4), dihidroxizeatina (DHZ) y zeatina (Z) en el WT y el mutante <i>Lfs2084</i>	74
Tabla 7	Análisis genético y fenotípico del mutante <i>Lfs2448</i>	77
Tabla 8	Resistencia o sensibilidad a la kanamicina (Km) en progenies de autofecundación de plantas mutantes.....	80
Tabla 9	Altura de las plantas, número de hojas y número de raíces aéreas en el hipocotilo y epicotilo de plantas <i>Alq</i> y WT.....	91
Tabla 10	Longitud del hipocotilo y epicotilo de plantas <i>Alq</i> y WT.....	92
Tabla 11	Longitud del hipocotilo, longitud de la raíz principal, número de raíces laterales, longitud de la 1 ^a , 2 ^a y 3 ^a raíz lateral más próxima al hipocotilo y número de raíces laterales que tienen una longitud de 3 o más cm en plantas WT y <i>Alq</i> de 7 y 25 días cultivadas <i>in vitro</i>	94
Tabla 12	Longitud del tallo, longitud de las raíces y número de hojas en plantas WT y <i>Alq</i> cultivadas en medio sin manitol y con 100 mM de manitol.....	97
Tabla 13	Caracterización del desarrollo reproductivo en plantas WT y <i>Alq</i>	100
Tabla 14	Porcentaje y peso medio de los frutos sin semilla en el WT y <i>Alq</i>	101
Tabla 15	Número de semillas por fruto y peso medio de frutos con semilla del WT y <i>Alq</i>	102

Tabla 17	Espesor, número de capas celulares y tamaño de las células del pericarpo de ovarios en estadio de antesis del WT y <i>Alq</i>	104
Tabla 18	Cuajado de frutos derivados del ovario y del cáliz a partir de flores WT y <i>Alq</i> emasculadas en pre-antesis.....	105
Tabla 19	Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo en plantas WT (Moneymaker) RNAi ALQ, RNAi TAG1 y RNAi ALQ/TAG1.....	115
Tabla 20	Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo en plantas WT y <i>Alq</i> cultivadas en condiciones control (sin sal) y de moderada salinidad (50 mM NaCl).....	117
Tabla 21	Comparación relativa del desarrollo reproductivo de las líneas tratadas con sal con respecto a la condición control tanto en el WT como en <i>Alq</i>	118

Resumen

La tasa de cuajado es un factor determinante en la producción de un cultivar. Este proceso, regulado en gran medida por señales hormonales, representa la primera etapa del desarrollo de un fruto y depende del éxito de la polinización y de la fecundación. A pesar de su importancia agronómica, los mecanismos moleculares que regulan el proceso del cuajado del fruto son aún desconocidos. La identificación y caracterización de mutantes afectados en la tasa de cuajado es una de las mejores estrategias para lograr este propósito.

En este trabajo de investigación hemos abordado la caracterización de tres mutantes insercionales de tomate afectados en la tasa de cuajado de fruto. Dos de estos mutantes, *Lower fruit setting 2084* y *2448* (*Lfs2084* y *Lfs2448*), identificados en el contexto de esta Tesis Doctoral, exhiben menor tasa de cuajado de fruto y presentan un patrón de herencia autosómica dominante. La caracterización de ambas mutaciones ha permitido descubrir que están asociadas a un fenómeno de letalidad del gameto masculino.

La mutación *Lfs2084* promueve la degeneración de los granos de polen que portan el inserto, pero también afecta al desarrollo reproductivo del ovario, lo que reduce de forma dramática la tasa de cuajado de fruto. El análisis del contenido endógeno de hormonas de este mutante parece indicar una alteración de la ruta del 2C-metil-Deritrol 4-fosfato (MEP), responsable de la síntesis de fitohormonas, pigmentos fotosintéticos y moléculas de defensa. Los menores contenidos de GA₁ en *Lfs2084*, la giberelina activa más importante en el inicio del desarrollo del fruto de tomate, podrían estar asociados con una mayor actividad del enzima catabólico SIGA2ox2. Estos resultados, junto con los cambios en los perfiles de expresión de *SIARF7* y *TAG1*, son coherentes con el fenotipo de menor tasa de cuajado observado en el mutante.

La mutación *Lfs2448* también promueve la degeneración de los granos de polen portadores del inserto, reduciendo en gran medida la cantidad de tubos polínicos que progresan a lo largo del estilo durante el proceso de polinización. Su caracterización molecular ha indicado que el fenotipo de *Lfs2448* podría estar ocasionado por la alteración de la función de uno o dos genes que codifican

proteínas CYP450 y que se expresan mayoritariamente en botones florales y frutos de 1 cm. Los resultados sugieren que la mutación desempeña un relevante papel en el desarrollo reproductivo de tomate, afectando al proceso de polinización y al cuajado de fruto.

Además, la caracterización del mutante *Arlequín (Alq)* ha revelado alteraciones en su programa de desarrollo vegetativo y reproductivo. Respecto al desarrollo vegetativo, *Alq* promueve un patrón de crecimiento más vigoroso que el que exhiben las líneas hermanas que carecen de la mutación, así como cambios en la configuración espacial del desarrollo radicular. Con relación al desarrollo reproductivo, *Alq* conduce a un mayor cuajado de fruto como consecuencia de eventos de división celular en el pericarpio del ovario previos al proceso de polinización. Un aspecto esencial desde un punto de vista agronómico es que la mayor tasa de cuajado permite que *Alq* mantenga la producción de fruto en condiciones de moderada salinidad.

Summary

Fruit setting rate is one of the most determining factors in the yield of a cultivar. This process, largely regulated by hormonal signals, is the first stage of fruit development and depends on the successful completion of pollination and fertilization. Despite their agronomic importance, the molecular mechanisms regulating the fruit setting process are still unknown. The identification and characterization of mutations affecting fruit set rate is one of the best strategies to achieve this purpose.

In this research work the characterization of three tomato insertional mutants altered in the fruit set rate has been addressed. Two of these mutants, *Lower fruit setting 2084 y 2448* (*Lfs2084* and *Lfs2448*), identified in the context of this Doctoral Thesis, exhibit decreased fruit set rate and present an autosomal dominant inheritance pattern. The characterization of both mutations allowed us to discover that they are associated with a phenomenon of lethality of the male gametes carrying the T-DNA insert.

The *Lfs2084* mutation not only promotes degeneration of pollen grains bearing the T-DNA, but also affects the reproductive development of the ovary, dramatically reducing the fruit set rate. Analysis of the endogenous hormone content of this mutant suggests an alteration of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway, responsible for the synthesis of phytohormones, photosynthetic pigments and plant defence molecules. The lower GA₁ content in *Lfs2084* mutant, the main active form to induce fruit development, may be associated with increased activity of the SIGA2ox2 catabolic enzyme. These results, together with the changes in the expression profiles of both *SIARF7* and *TAG1* genes, are consistent with the phenotype of lower fruit set rate.

The *Lfs2448* mutation also promotes degeneration of the pollen grains carrying the T-DNA, largely reducing the number of pollen tubes that progress along the style during the pollination process. Its molecular characterization indicated that the *Lfs2448* mutant phenotype could be caused by the functional alteration of one or two genes that encode CYP450 proteins mostly expressed in floral buds and young fruits. Results suggest that the tagged gene plays an important role in

tomato reproductive development, affecting both normal pollination and fruit set process.

Furthermore, the characterization of the *Arlequín* (*Alq*) mutant revealed alterations in its vegetative and reproductive developmental program. As regards vegetative development, *Alq* mutation promotes a more vigorous growth pattern, as well as changes in the spatial configuration of root system. Regarding reproductive development, *Alq* mutation leads to increased fruit set as a consequence of cell division events in the ovary pericarp prior to the pollination process. Finally, it should be noted that, thanks to its higher fruit set rate, the *Arlequin* mutant is capable of maintaining fruit production in moderate salinity conditions, which is of great importance from an agronomic point of view.

Resum

La taxa de quallat és un factor determinant en la producció d'un cultivar. Aquest procés, regulat en gran mesura per senyals hormonals, representa la primera etapa del desenvolupament d'un fruit i depèn de l'èxit de la pol·linització i de la fecundació. A pesar de la seua importància agronòmica, els mecanismes moleculars que regulen el procés de quallat són encara desconeguts. La identificació i caracterització de mutants afectats en la taxa de quallat és una de les millors estratègies per aconseguir aquest propòsit.

En aquest treball d'investigació hem abordat la caracterització de tres mutants insercionals de tomaca afectats en la taxa de quallat de fruit. Dos d'aquests mutants, *Lower fruit setting 2084* i *2448* (*Lfs2084* i *Lfs2448*), identificats en el context d'aquesta Tesi Doctoral, exhibixen una menor taxa de quallat de fruit i presenten un patró d'herència autosòmica dominant. La caracterització d'ambdós mutacions ha permés descobrir que es troben associades a un fenomen de letalitat del gàmeta masculí.

La mutació *Lfs2084* promou la degeneració dels grans de pol·len que porten l'insert, però també afecta el desenvolupament reproductiu de l'ovari, la qual cosa redueix de forma dramàtica la taxa de quallat de fruit. L'anàlisi del contingut endogen d'hormones d'aquest mutant pareix indicar una alteració de la ruta 2C-metil-Deritrol 4-fosfato (MEP), responsable de la síntesi de fitohormones, pigments fotosintètics i molècules de defensa. Els menors continguts de GA₁ en *Lfs2084*, la gibberel·lina activa més important a l'inici del desenvolupament del fruit de tomaca, podrien estar associats amb una major activitat de l'enzim catabòlic SIGA2ox2. Aquests resultats, juntament amb els canvis en els perfils d'expressió de *SIARF7* i *TAG1*, són coherents amb el fenotip de menor taxa de quallat observat en el mutant.

La mutació *Lfs2448* també promou la degeneració dels grans de pol·len portadors de l'insert, reduint en gran mesura la quantitat de tubs pol·línics que progressen al llarg de l'estil durant el procés de pol·linització. La seua caracterització molecular ha indicat que el fenotip de *Lfs2448* podria estar ocasionat per una alteració de la funció d'un o dos gens que codifiquen proteïnes CYP450 i que s'expressen majoritàriament en botons florals i fruits d'un centímetre. Els resultats suggerixen

que la mutació té una funció important en el desenvolupament reproductiu de la tomaca, afectant el procés normal de pol·linització i el quallat de fruit.

A més, la caracterització del mutant *Arlequín* (*Alq*) ha revelat alteracions en el seu programa de desenvolupament vegetatiu i reproductiu. Pel que fa al desenvolupament vegetatiu, *Alq* promou un patró d'expressió més vigorós que el que exhibixen les línies germanes que no porten la mutació, així com canvis en la configuració espacial del desenvolupament radicular. Quant al desenvolupament reproductiu, *Alq* conduïx a un major quallat de fruit com a conseqüència d'events de divisió cel·lulars en el pericarp de l'ovari previs al procés de pol·linització. Un aspecte essencial des d'un punt de vista agronòmic és que la major taxa de quallat permet que *Alq* mantinga la producció de fruit en condicions de moderada salinitat.

1. Introducción

1.1. El desarrollo reproductivo en tomate: floración

1.1.1. Transición a la floración

La reiteración y ampliación del patrón corporal básico establecido durante la embriogénesis tiene su origen en unas estructuras especiales denominadas meristemos, que están formadas por células indiferenciadas que se dividen de manera organizada (Evans y Barton, 1997). Al inicio de la embriogénesis se establecen los dos meristemos principales que van a generar el eje apical-basal de la planta: el meristemo apical del tallo (SAM, del inglés *Shoot Apical Meristem*), que dará lugar a la parte aérea de la planta, y el meristemo apical de la raíz (RAM, del inglés *Root Apical Meristem*), que originará las raíces. A lo largo del desarrollo de la parte aérea de la planta, el SAM experimentará dos programas de desarrollo, el vegetativo y el reproductivo. En la fase de desarrollo vegetativo, el SAM diferencia en posiciones laterales órganos vegetativos, como es el caso de los primordios de hoja (figura 1A). Durante la fase reproductiva, tras la inducción floral, el SAM se transformará en meristemo de inflorescencia dando lugar a la formación de otros meristemos de inflorescencia secundarios, y éstos a su vez a meristemos florales (figura 1B). En los flancos de los meristemos florales se inicia la formación de los primordios de órganos florales, que tras sucesivos ciclos de división y expansión celular, darán lugar a las flores.

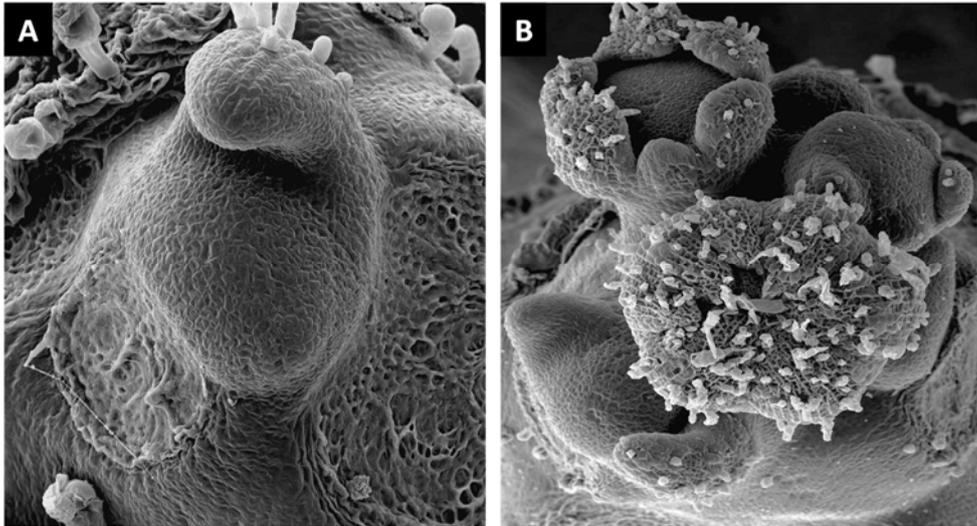


Figura 1. A) Meristemo apical de tallo y B) meristemos florales en diferentes estadios de desarrollo. Imágenes de microscopía electrónica de barrido.

En tomate, la transición floral tiene lugar de forma autónoma, es decir, independientemente de factores externos. Se considera que el tomate es una planta de día neutro, ya que el tiempo de floración, medido como el número de hojas desarrolladas hasta la primera inflorescencia, no se ve afectado por el fotoperiodo (Kinet y Peet, 1997). A diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* donde el hábito de crecimiento es monopodial, el tomate exhibe un hábito de crecimiento simpodial. En las especies que exhiben una arquitectura monopodial, el SAM es indeterminado y los órganos vegetativos y reproductivos se generan en sus flancos. Sin embargo, el SAM de tomate es determinado y el desarrollo del primer brote se completa cuando aparece la primera inflorescencia. Los genes *FALSIFLORA* (*FA*), ortólogo del gen *LEAFY* (*LFY*) de *Arabidopsis*, y *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*), similar al integrador floral *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) de *Arabidopsis*, actúan como promotores clave de la floración en tomate (Molinero-Rosales et al, 1999; Lifschitz et al, 2006; Lifschitz y Eshed, 2006; Shalit et al, 2009). Otro de los genes que participan en la identidad del meristemo floral es *ANANTHA* (*AN*), un gen F-box ortólogo al gen de identidad floral de *Arabidopsis* *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*). El gen *SFT*, además de ser clave en la transición floral, también está implicado en el mantenimiento de la identidad del meristemo de inflorescencia (Molinero-Rosales et al, 2004). *JOINTLESS* (*J*), que pertenece al mismo grupo que los genes *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) y *AGAMOUS LIKE 24* (*AGL24*) de *Arabidopsis*, y *MACROCALYX* (*MC*), perteneciente al grupo *APETALA1* (*AP1*) / *FRUITFULL* (*FUL*), son dos genes MADS-box que también están implicados en el mantenimiento de la identidad del meristemo de inflorescencia (Philouze 1978;

Szymkowiak y Irish, 1999; 2006; Vrebalov et al, 2002; Yuste-Lisbona et al, 2016). Del mismo modo, los genes *UNIFLORA (UF)* y *BLIND (BL)* desempeñan funciones principales en el mantenimiento de la identidad del meristemo de inflorescencia (Dielen et al, 1998; Schmitz et al, 2002; Dielen et al, 2004; Quinet et al, 2006; Quinet et al, 2011). Por otro lado, la formación de los meristemas florales depende de que se mantenga la indeterminación de los meristemas de inflorescencia. En esta función participa el gen *COMPOUND INFLORESCENCE (S)*, que codifica un factor de transcripción homólogo a *WUSCHEL-HOMEODOMAIN 9 (WOX9/STIMPY)*.

1.1.2. Especificación de la identidad de los órganos florales

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

Una vez que se ha determinado el meristemo floral, el desarrollo de la flor requiere de la diferenciación de regiones meristemáticas que poseen una identidad distinta: son los primordios de órganos florales. En tomate, los cuatro tipos de primordios de órganos florales se disponen en cuatro verticilos concéntricos que se inician alrededor de los flancos de los meristemas florales. En primer lugar aparecen los primordios de sépalos seguidos por los primordios de pétalos y estambres, y finalmente surgen los primordios de carpelos. En el estado maduro, el primer verticilo de la flor de tomate está compuesto por 5-6 sépalos, el segundo tiene un número similar de pétalos, en el tercer verticilo hay 6 estambres que forman un cono alrededor del estilo y el cuarto verticilo lo compone un número variable de carpelos fusionados.

Los cuatro verticilos florales se desarrollan como resultado de funciones genéticas solapantes que especifican la identidad de los órganos florales de acuerdo al modelo combinatorio ABC(DE) (figura 2; revisado por Causier et al, 2010). Según este modelo, en *Arabidopsis* la expresión de la función A en el primer verticilo da lugar a los sépalos, la expresión de las funciones A y B en el segundo verticilo da lugar a los pétalos, la expresión de las funciones B y C en el tercer verticilo da lugar a los estambres, y la expresión de la función C en el cuarto verticilo da lugar a los carpelos (Weigel y Meyerowitz, 1994). El

descubrimiento de dos nuevas clases de genes obligó a extender este modelo (Gutierrez-Cortines and Davies, 2000). Los genes de función D son esenciales para la identidad del óvulo (Colombo et al, 1995) y los de tipo E establecen el contexto floral en el que los genes A, B y C actúan (Pelaz et al, 2000; Honma y Goto 2001; Ditta et al, 2004).

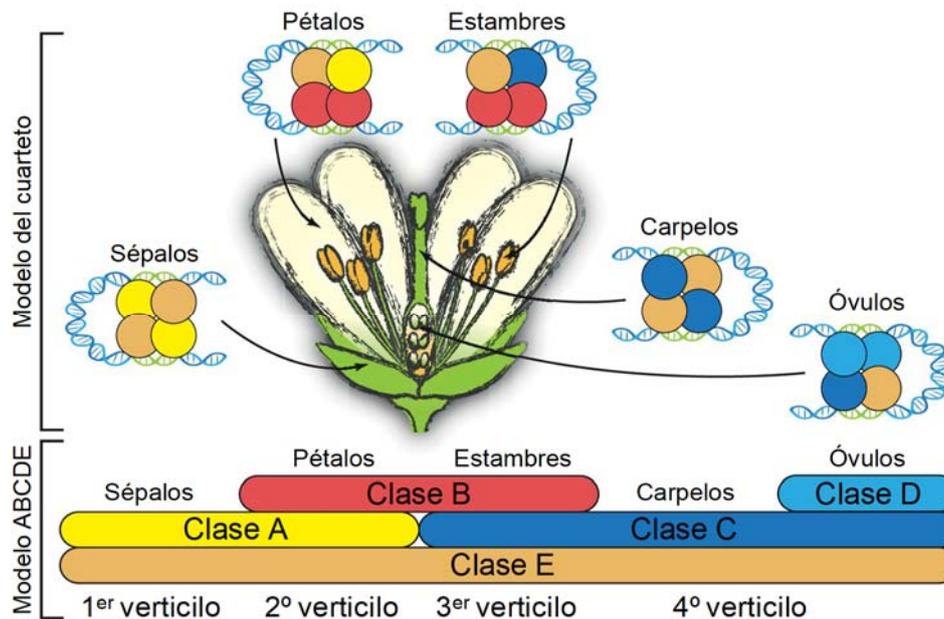


Figura 2. El modelo del cuarteto floral y determinación de la identidad de los órganos florales a través de genes de función ABCDE. La parte superior de la figura representa una versión del modelo del cuarteto floral, que ilustra la especificación de los cinco órganos florales (sépalos, pétalos, estambres, carpelos y óvulos) mediante la formación de tetrámeros específicos de factores de transcripción (los colores indican a qué clase pertenece cada factor). La parte inferior de la figura ilustra el modelo genético ABCDE. Los genes de clase A se expresan en los primordios del 1^{er} y 2^o verticilo de la flor, los genes de clase B en el 2^o y 3^{er} verticilo, los genes de clase C en los verticilos 3 y 4, los genes de clase D en partes del 4^o verticilo (primordios de óvulo), y los genes de clase E se expresan en los cuatro verticilos. Los genes de clase A y E especifican sépalos en el 1^{er} verticilo, los genes de clase A, B y E especifican pétalos en el 2^o verticilo, los genes de clase B, C y E especifican estambres en el 3^{er} verticilo, los genes de clase C y E especifican carpelos en el 4^o verticilo y la clase C, D y E controla el desarrollo de los óvulos en el cuarto verticilo de la flor (adaptado de Theißen et al, 2016).

En *Arabidopsis*, el denominado modelo ABC (Coen y Meyerowitz, 1991; Meyerowitz et al, 1991) asume que mutaciones que afecten a genes de la clase A, B o C promueven cambios homeóticos en los órganos florales de dos verticilos consecutivos. Más recientemente se ha descrito que los genes de clase A y C se regulan negativamente, por lo que la función de C se expresa en la flor cuando la función A se encuentra mutada, y viceversa (Bowman et al, 2012; Wellmer et al, 2014). La mayoría de los genes ABC forman parte de la familia de factores de transcripción MADS-box, altamente conservados entre especies. Las proteínas

MADS se unen al DNA en forma de complejos multiméricos (figura 2), controlando de esa forma el desarrollo de los órganos florales (Robles y Pelaz, 2005).

En tomate, el aislamiento de genes homeóticos y la caracterización de mutantes alterados en la identidad de los órganos florales han permitido conocer algunos de los determinantes implicados en el control genético del desarrollo floral de esta especie. *MC* es un gen de clase A y la pérdida de su función promueve, además de alteraciones en el meristemo de inflorescencia, la conversión homeótica de sépalos en estructuras tipo hojas sin que la identidad de los pétalos se vea alterada (Vrebalov et al, 2002; Yuste-Lisbona et al, 2016). La función B está controlada por dos parálogos del gen *APETALA3* (*TAP3* y *TM6*) junto con otros dos del gen *PISTILLATA* (*TPI* y *SIGLO*) (Pnueli et al, 1991; Kramer et al, 1998; Busi et al, 2003; de Martino et al, 2006; Leseberg et al, 2008; Geuten y Irish, 2010; Quinet et al, 2014). Por lo que respecta a la clase C, *TOMATO AGAMOUS 1* (*TAG1*) determina la identidad de estambres y carpelos (Pnueli et al, 1994a). Entre los genes de clase E se encuentran *TOMATO MADS BOX GENE 5* (*TM5*) (Pnueli et al, 1994a) y *TM29* (Ampomah-Dwamena et al, 2002), mientras que el gen *TOMATO AGAMOUS LIKE 11* (*TAGL11*) determina la función D (Busi et al, 2003).

1.1.3. Desarrollo de las anteras y del gametofito masculino

1.1.3.1. Componentes genéticos relacionados con el desarrollo de las anteras

En tomate se han identificado mutantes afectados en la función B que exhiben transformaciones parciales o completas en el tercer verticilo floral (Nash et al, 1985; Sawhney, 1992). Por ejemplo, los mutantes alélicos *stamenless* (*sl*) y *corollaless* (*cl*) desarrollan sépalos en vez de pétalos en el segundo verticilo y carpelos en vez de estambres en el tercer verticilo (Gómez et al, 1999). *SL* (syn. *TAP3*), un gen de clase B, es el ortólogo de *DEFICIENS* (*DEF*) de *Antirrhinum* y *APETALA3* (*AP3*) de *Arabidopsis*, ambos implicados en el desarrollo de pétalos y estambres. Este gen se clonó a partir del mutante *tap3* de la colección de líneas de inserción con el sistema Ac/Ds obtenida por el grupo de Avraham Levy (Meissner et al, 2000). *TAP3* codifica un factor de transcripción de la familia MADS-box requerido para la especificación de la identidad de pétalos y estambres (de Martino et al, 2006). En tomate, a diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis*, existen dos linajes parálogos de clase B: *euAP3* y *TM6*. Los genes *TAP3* y *TM6* poseen funciones diferentes, aunque parcialmente redundantes, que pueden ser adscritas a sus dominios de expresión (de Martino et al, 2006). En

este sentido, se ha comprobado que la pérdida de función de *TAP3* da lugar a transformaciones homeóticas en pétalos y estambres, mientras que la anulación de función de *TM6* conduce principalmente a cambios homeóticos en estambres. Según de Martino et al (2006), la función ancestral del linaje *AP3* estaba relacionada con la especificación de la identidad de los estambres, pero una duplicación y diversificación de este linaje condujo a la adquisición de funciones relacionadas con la especificación de la identidad de pétalos.

Hasta la fecha no se han descrito mutantes de tipo C en tomate, es decir, mutantes con cambios homeóticos en los órganos reproductivos. Sin embargo, la clonación del gen *AGAMOUS1* de tomate (*TAG1*), un ortólogo del gen *AGAMOUS* (*AG*) de *Arabidopsis*, y su análisis de función mediante sobre-expresión y silenciamiento ha permitido corroborar el papel que desempeña este gen en la especificación de la identidad de los estambres y carpelos (Pnueli et al, 1994a; Giménez et al, 2016).

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

Además de las citoquininas y giberelinas; las auxinas, el ácido jasmónico y el etileno también intervienen en el desarrollo de las anteras. Según Spena et al (1992), un aumento de la concentración de auxinas en anteras en las primeras etapas de su formación promueve un descenso de la actividad de las giberelinas alterando su desarrollo. También se ha comprobado que en el mutante de tomate androestéril *sl-2*, reversible mediante aplicación exógena de giberelinas, la reducción de ácido indolacético como consecuencia de bajas temperaturas restaura la fertilidad de anteras sin la necesidad de que se apliquen giberelinas (Singh y Sawney, 1991). Así pues, se asume que la actividad de las giberelinas en el desarrollo de anteras está modulada por auxinas y citoquininas. Adicionalmente, se ha reportado que el ácido jasmónico y el etileno están implicados en la maduración del polen, la dehiscencia de la antera y la antesis de la flor (Sanders et al, 2000; Ishiguro et al, 2001; Rieu et al, 2003).

Los mutantes *sl*, *tap3* o *sl-2* son androestériles porque adolecen de anomalías en la estructura de la antera. La androesterilidad de este tipo de mutantes es estructural, es decir, las anteras son aberrantes y el polen no es funcional. En definitiva, los genes alterados en estos mutantes desempeñan una función principal en el desarrollo de la antera. Sin embargo, se han descrito otros mutantes que desarrollan anteras aparentemente normales, pero que no tienen polen o que el polen no es funcional. Este tipo de mutantes presenta, por tanto, una androesterilidad de tipo esporógena.

1.1.3.2. Componentes genéticos relacionados con el desarrollo del polen

La formación de los granos polen en los lóculos de las anteras tiene lugar a través de dos fases: la microsporogénesis y la microgametogénesis. Durante la microsporogénesis, el tejido esporógeno diploide de las células madres de polen (PMC, del inglés *Pollen Mother Cells*) o microsporocitos forma, a través de la meiosis, tétradas de microsporas que se encuentran encerradas en una espesa pared de calosa. En una etapa posterior se produce la reabsorción de la calosa, lo que permite que las microsporas se liberen gracias a un complejo enzimático (calasa) que es secretado por el *tapetum* o tapete, la capa celular más interna del esporofito que bordea los lóculos de las anteras (Scott et al, 2004). En la fase de microgametogénesis, la microspora experimenta un crecimiento celular notable (figura 4) debido a la síntesis de las paredes celulares (exina e intina), la génesis de la vacuola y eventos de fusión (Owen y Makaroff, 1995; Yamamoto et al, 2003). En paralelo, el núcleo migra hacia la pared celular y la microspora

polarizada experimenta una primera mitosis haploide (PMI, del inglés *Pollen Mitosis I*) altamente asimétrica que da lugar a un grano de polen binucleado que contiene dos células: la vegetativa y la generativa o espermática (figura 3).

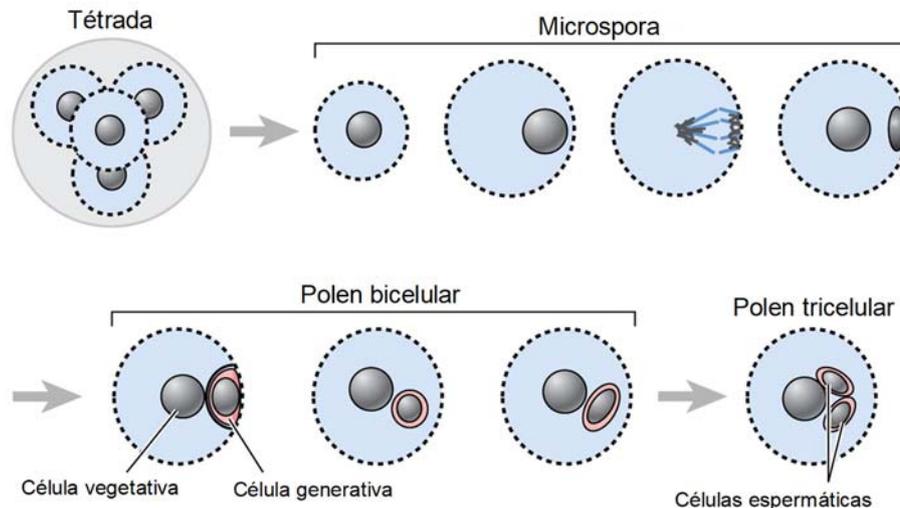


Figura 3. Eventos citológicos relacionados con la especificación de las células germinales masculinas a partir del estadio de tetrada en Arabidopsis (adaptado de Berger y Twell, 2011).

La primera mitosis haploide es un evento de referencia en el desarrollo del polen toda vez que da lugar a dos células con estructuras y destinos diferentes. La célula vegetativa acumula reservas (carbohidratos y/o lípidos) necesarias para la germinación del tubo polínico (Pacini, 1996). Por su parte, la célula generativa experimenta una segunda mitosis (PMII) formando dos núcleos espermáticos que fecundarán a la oófera y a los dos núcleos polares de la célula central del saco embrionario durante la doble fertilización de las angiospermas. En Arabidopsis y maíz, el grano maduro de polen es trinucleado, ya que la segunda mitosis ocurre antes de que tenga lugar la liberación de los granos de polen (figura 3). Sin embargo, en tomate se produce después de la formación del tubo polínico, es decir, el grano maduro de polen es binucleado (Ma et al, 2005). Durante la maduración del grano de polen se produce su deshidratación progresiva confiriéndole una ligera reducción de volumen (Firon et al, 2012).

Como se comentaba en el párrafo anterior, el *tapetum* desempeña un papel clave durante la formación del grano de polen (Parish y Li, 2010). En efecto, este tejido esporofítico, que degenera a lo largo del proceso, participa en la nutrición de las microsporas (Shivanna y Johri, 1985; Chapman, 1987; Pacini, 1990). Asimismo, secreta enzimas (calasa) que conducen a la liberación de las microsporas y participa en la formación de los precursores de la exina, como la

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

Además del *tapetum*, otras capas celulares de la antera son igualmente importantes para el proceso reproductivo. Por ejemplo, ciertos mutantes desarrollan anteras con polen funcional; sin embargo, se consideran androestériles debido a que no se produce la apertura de los sacos polínicos y, por ende, la polinización. A este tipo de mutantes se les denomina mutantes con

androesterilidad funcional. Es el caso de los mutantes *positional sterile* (*ps*) (Larson y Paur, 1948) y *positional sterile-2* (*ps2*) (Tronickova, 1962), ambos con anteras indehiscentes debido a una alteración en el estomio. El mutante *ps* exhibe fusión de pétalos y un fenotipo parecido al del mutante *slcer6*, aunque todavía no se ha realizado el ensayo de alelismo para determinar si los alelos mutantes pertenecen al mismo gen o a genes distintos (Leide et al, 2011). Por lo que respecta al mutante *ps-2*, se sabe que la mutación afecta a un gen implicado en la síntesis de poligalacturonasa (Gorguet et al, 2009). Senatore et al (2009) identificaron, secuenciaron y caracterizaron el gen *SICysEP*, que codifica una cisteínasa con cola *KDEL*. Según los autores, el gen está implicado en la dehiscencia de las anteras y se acumula en los tejidos esporofíticos rodeando los lóculos de las anteras.

Otro tipo de mutaciones son las que generan esterilidad gametofítica. Estas afectan a genes que intervienen después de la meiosis, en la fase haploide del desarrollo del polen. En *Arabidopsis* se han empleado diversas estrategias de escrutinio para seleccionar mutantes alterados en el desarrollo del gametofito. En esta especie se han identificado en torno a 50 mutaciones gametofíticas, así como 37 genes que afectan el desarrollo post-meiótico del gametofito masculino (Twell, 2010). En tomate se conocen pocos genes que desempeñen un papel clave en el desarrollo post-meiótico. En efecto, la mayor parte de las mutaciones de tomate descritas alteran la funcionalidad del polen en etapas previas. Por ejemplo, el polen del mutante de tomate androestéril *7B-1* colapsa antes de la meiosis de los microsporocitos (Sheoran et al, 2009), y *pmcd1* (*pre-meiotic cytokinesis defect 1*) forma gametos diploides debido a una endomitosis ectópica en los microsporocitos antes de que se produzca la meiosis (De Storme y Geelen, 2013). Con todo, se han estudiado algunos genes que podrían desempeñar alguna función importante en las etapas post-meióticas del desarrollo del polen. Así, el gen de tomate *LeProT1*, un homólogo de un transportador de prolina en *Arabidopsis*, se expresa de manera específica tanto en el grano de polen maduro como durante su germinación. Se ha sugerido que *LeProT1* facilita la integración de la prolina y de los solutos compatibles necesarios para el desarrollo y desecación del polen (Schwacke et al, 1999). Sin embargo, recientemente se ha comprobado que la mutación *prot1-1* no altera la viabilidad del polen en *Arabidopsis*, lo que puede ser debido a que otro gen de la misma familia complementa funcionalmente la ausencia de función de *ProT1* (Biancucci et al, 2015). También se sabe que la actividad del gen *LAT32*, que codifica una proteína

glicosilada resistente al calor, es necesaria para la hidratación del polen y/o su germinación (Muschietti et al, 1994). David-Schwartz et al (2013) observaron que los genes *fructokinase 4* (*SIFRK4*), relacionados con el metabolismo de los azúcares, y *LIN7*, que codifica una invertasa, se co-expresan en polen maduro y durante la germinación. Los autores sugieren que esta expresión conjunta regula el mecanismo a través del cual se administran los carbohidratos al gametofito masculino durante los últimos estadios de su desarrollo. El único mutante gametofítico en tomate en el que se conoce el gen alterado es *legwd::Ds* (Nashilevitz et al, 2009). En este mutante, la inserción de un transposón en el gen *SIGWD*, que codifica una enzima implicada en la fosforilación del almidón, promueve letalidad gamética masculina como consecuencia de una elevada acumulación de almidón y niveles reducidos de azúcares en los granos maduros de polen.

1.1.4. Desarrollo de los ovarios y del gametofito femenino

El desarrollo de una flor como una estructura verticilada y determinada implica que la determinación del meristemo floral podría ocurrir desde el momento en el que se ha adquirido la identidad del carpelo. En *Arabidopsis*, este proceso está regulado por *WUSCHEL* (*WUS*) y *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) operando en diferentes dominios meristemáticos (Lozano et al, 2009). El cese de la actividad en el meristemo floral depende de un proceso de retro-alimentación en el que están presentes los genes *WUS*, *LFY* y *AG*, de forma que los dos primeros activan la expresión de *AG*, pero cuando se ha completado el desarrollo de los órganos florales, *AG* reprime indirectamente la actividad de *WUS* a través *KNUCKLES* (*KNU*), un represor transcripcional C2H2 zinc finger (Lohmann et al, 2001; Sun et al, 2014). Mientras que *WUS* se expresa tanto en el SAM como en el meristemo floral, *LFY* es específico del meristemo floral. Por otro lado, la vía de señalización *WUS* / *CLAVATA* (*CLV*) mantiene la homeostasis del nicho de células indiferenciadas en el meristemo floral (Schoof et al, 2000). Tanto en *Arabidopsis* como en tomate, mutaciones en los genes *CLV* promueven el aumento del tamaño del meristemo floral mediante la expansión de los dominios de expresión de *WUS*, dando lugar a flores con mayor número de órganos (Xu et al, 2015).

En petunia, la formación de complejos multiméricos entre factores de transcripción MADS-box de las clases C, D y E podría ser responsable de la represión de *TERMINATOR*, el gen homólogo a *WUS* en esta especie (Ferrario et

al, 2006). Por lo que respecta a tomate, la anulación de función de *TAG1* promueve la indeterminación de la flor y sustitución de los carpelos por estructuras florales ectópicas. Tales cambios homeóticos confirman el papel que desempeña *TAG1* en la determinación del meristemo floral (Pnueli et al, 1994a). Sin embargo, no se ha descrito interacción entre los genes *TAG1* y *SIWUS*. El cese de la actividad del meristemo floral, actuando como un represor de *SIWUS*, está regulado por el gen *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY (IMA)*, que codifica una proteína MIF (mini zinc finger). Además, *IMA* participa en la iniciación del primordio de óvulo activando la expresión de genes de clase D (Sicard et al, 2008). Por tanto, *IMA* inhibe la proliferación celular durante la determinación del meristemo floral, controla el número de carpelos durante el desarrollo floral y actúa como un represor de *SIWUS*, el gen organizador del meristemo en tomate. Recientemente, la caracterización del mutante *excessive number of floral organ (eno)* permitió identificar un nuevo factor de transcripción cuya alteración incrementa significativamente el tamaño del meristemo floral, dando lugar a frutos de mayor calibre y con mayor contenido en carne (Fernandez-Lozano et al, 2015). Según los autores, *ENO* garantiza que la determinación floral se produzca de forma coordinada en espacio y tiempo para asegurar la correcta formación de los carpelos.

En *Arabidopsis*, la especificación de la identidad del carpelo requiere de la actividad de genes de función C (i.e. *AG*) y E (i.e. *SEP*) (ver figura 2). No obstante, se ha demostrado que se pueden desarrollar órganos carpeloides en ausencia de actividad de *AG*, lo que sugiere que deben de existir rutas adicionales independientes de *AG* que pueden especificar el desarrollo del carpelo (Pinyopich et al, 2003). *SHATTERPROOF1 (SHP1)*, *SHP2* y *SEEDSTICK (STK)* son los genes que parece que actúan en estas rutas. De hecho, *AG* actúa de forma redundante con los genes *SHP* promoviendo el desarrollo del carpelo. Por otra parte, *AG*, *SHP* y *STK* desempeñan papeles redundantes en la especificación de la identidad del óvulo (Liljegren et al, 2000; Favaro et al, 2003; Pinyopich et al, 2003). Aunque no se han demostrado interacciones proteína-proteína entre los genes *AG*, *SHP* y *STK*, los tres interactúan con *SEP3*, lo que sugiere que las proteínas *SEP* median en la formación de un complejo proteico implicado en especificar la identidad de óvulo y carpelo (Favaro et al, 2003). Mediante la sobre-expresión y anulación de función de los genes MADS-box *FBP7* y *FBP11*, dos ortólogos de *STK* en petunia, se han confirmado sus

funciones específicas en óvulos y sus interacciones con las proteínas tipo *SEPALLATA FBP2*, *FBP5* y *FBP9* (Angenent et al, 1995; Ferrario et al, 2003).

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

TAG1, el ortólogo de *AG* en tomate, se requiere para el adecuado desarrollo de los carpelos en el cuarto verticilo floral (Pnueli et al, 1994a). Se han aislado otros genes MADS-box tipo *AG* que se expresan a lo largo del desarrollo del fruto de tomate. Es el caso de *ARLEQUÍN (ALQ / TAGL1)* y *TAGL11*, cuyas secuencias de nucleótidos comparten una elevada similitud con *SHP1 (AGL1)* y *STK (AGL11)* respectivamente (Busi et al, 2003; Giménez et al, 2010). Los patrones de expresión de *ALQ* y *TAGL11* son muy similares, y sus transcritos se detectan primordialmente en los integumentos interiores del óvulo y las paredes del carpelo. El silenciamiento de *ALQ* no altera la funcionalidad de los óvulos (Giménez et al, 2010; 2015), lo que sugiere que *TAGL11* podría asumir la función de *ALQ* en este órgano. Experimentos llevados a cabo en levadura han revelado la formación de dímeros entre *ALQ* y *TAGL11*. Por tanto, es posible que en el desarrollo del óvulo, la menor actividad de uno de los genes sea compensada por el otro. De hecho, en un trabajo reciente se ha reportado que los fenotipos de sobre-expresión de *TAGL11 (SI-AGL11)* en tomate son similares a los promovidos por la sobre-expresión de *ALQ*, y que el silenciamiento de *SI-AGL11* sólo parece tener un leve efecto sobre el tamaño de la semilla (Huang et al, 2017).

Los genes tipo *GAMYB*, pertenecientes a la familia de factores de transcripción MYB R2R3, están regulados por giberelinas y por la familia de micro RNAs 159 en diferentes tejidos y especies (Gubler et al, 1995; Tsuji et al, 2006; Alonso-Peral et al, 2010). Desempeñan una importante función en diversos procesos del desarrollo, lo que incluye el desarrollo de la antera y la transición floral (Alonso-Peral et al, 2010; Aya et al, 2011; Li et al, 2013). Da Silva et al

(2013) demostraron que los genes *SIGAMYB1* y *SIGAMYB2* son claves para el desarrollo del óvulo. Recientemente se ha identificado un mutante de tomate, al que se le denominó *hydra*, que es completamente estéril al no desarrollar ningún tipo de gametofitos (Rojas-Gracia et al, 2016). La caracterización funcional de *HYDRA*, que codifica un factor de transcripción tipo DOF (*DNA-binding One Zinc Finger*), que es ortólogo de *SPOROCTELESS/NOZZLE (SPL/NZZ)* de *Arabidopsis*, indicó que el gen desempeña un papel fundamental en el desarrollo de los gametofitos masculino y femenino.

1.2. El desarrollo reproductivo en tomate: fructificación

1.2.1. El proceso de la polinización y fertilización

La reproducción sexual conlleva la unión de dos células diferenciadas conocidas como gametofitos con una dotación cromosómica haploide. Las plantas con flor tienen dos tipos de gametofitos: el gametofito masculino (polen) que se origina en los estambres y el femenino (óvulo) que lo hace en el ovario. Previamente, las microsporas o células madre deben sufrir meiosis para producir tétradas de microsporas en la antera, o cuatro megasporas en el óvulo. Como se indicaba en el apartado 1.1.3, las microsporas liberadas de la tétrada sufren una mitosis asimétrica para formar el polen bicelular o tricelular en función de la especie (ver figura 3). En el interior del óvulo solo sobrevive una megaspora, denominada megaspora funcional, que experimenta tres divisiones mitóticas, dando lugar a 8 núcleos, cuatro en cada extremo del saco embrionario (figura 4). Dos de estos núcleos migran hacia el centro para dar lugar a la célula central. Posteriormente se produce la diferenciación celular para que se desarrolle un saco embrionario con siete células: tres antípodas ($1n$) al final de la chalaza, una célula central con dos núcleos polares ($2n$), dos sinérgidas ($1n$) y una ovocélula ($1n$) al final del micrópilo (figura 4). Durante el proceso de la polinización, el grano de polen alcanza el estigma de la flor y germina desarrollando el tubo polínico, que crece a través del estilo dirigiéndose a los óvulos (figura 5). En este momento, en especies con grano de polen bicelular (e.g. tomate), la célula generativa del grano de polen se divide en dos células espermáticas, mientras que en especies con polen tricelular (i.e. *Arabidopsis*), la división de la célula generativa se produce antes de la emisión del tubo polínico. En cualquiera de los dos casos, las células espermáticas viajan a lo largo del tubo polínico hasta alcanzar el gameto femenino. Cuando el extremo del tubo polínico llega al micrópilo del saco embrionario, el tubo crece hacia el interior del saco embrionario

a través de una de las sinérgidas que flanquean la ovocélula, descargando allí su contenido.

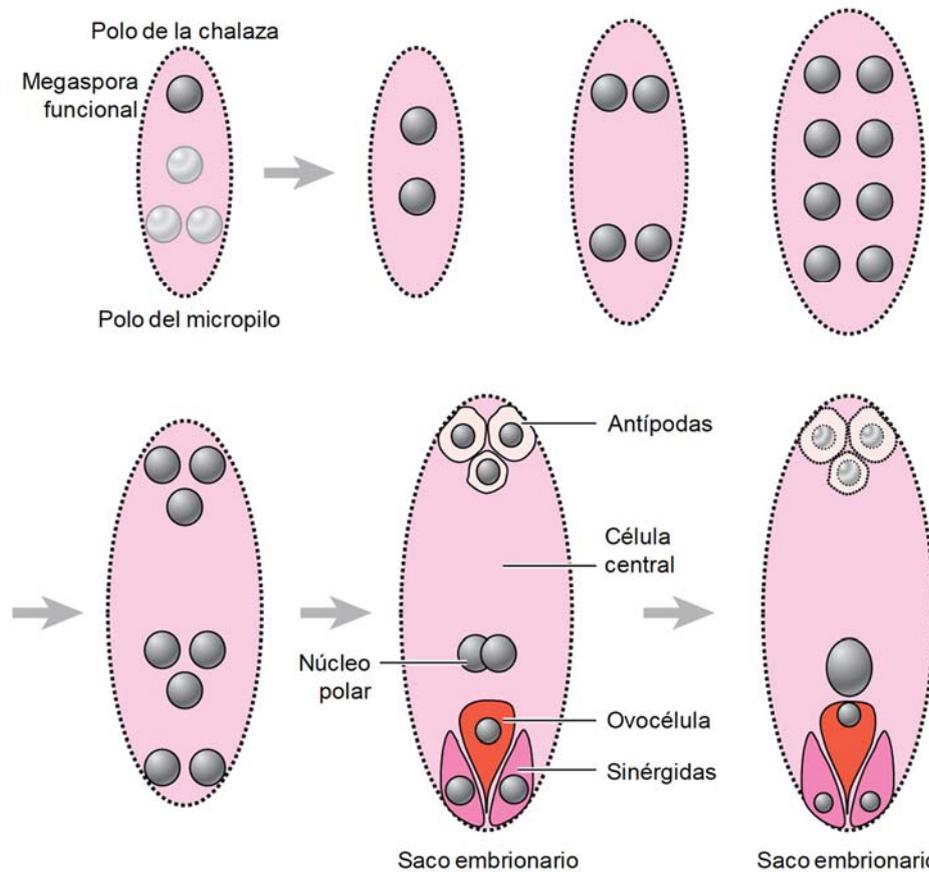


Figura 4. Eventos citológicos relacionados con la especificación de las células germinales femeninas en *Arabidopsis* (adaptado de Berger y Twell, 2011).

Uno de los núcleos espermáticos (n) se fusiona con la ovocélula (n) produciendo el cigoto ($2n$) que desarrollará la siguiente generación esporofítica. El segundo núcleo espermático o gameto masculino (n) se fusiona con los dos núcleos polares (n) de la célula central del saco embrionario produciendo el tejido nutritivo triploide ($3n$), denominado endospermo, que actúa como tejido de reserva para el crecimiento y desarrollo del embrión (Dumas y Rogowsky 2008, Sabelli y Larkins 2009). A este proceso se le denomina doble fertilización, aunque la verdadera fertilización es la unión de la ovocélula con una de las células espermáticas. La fertilización provoca que los integumentos del óvulo formen una cubierta, normalmente de consistencia dura y resistente, que se convertirá en la testa de la semilla.

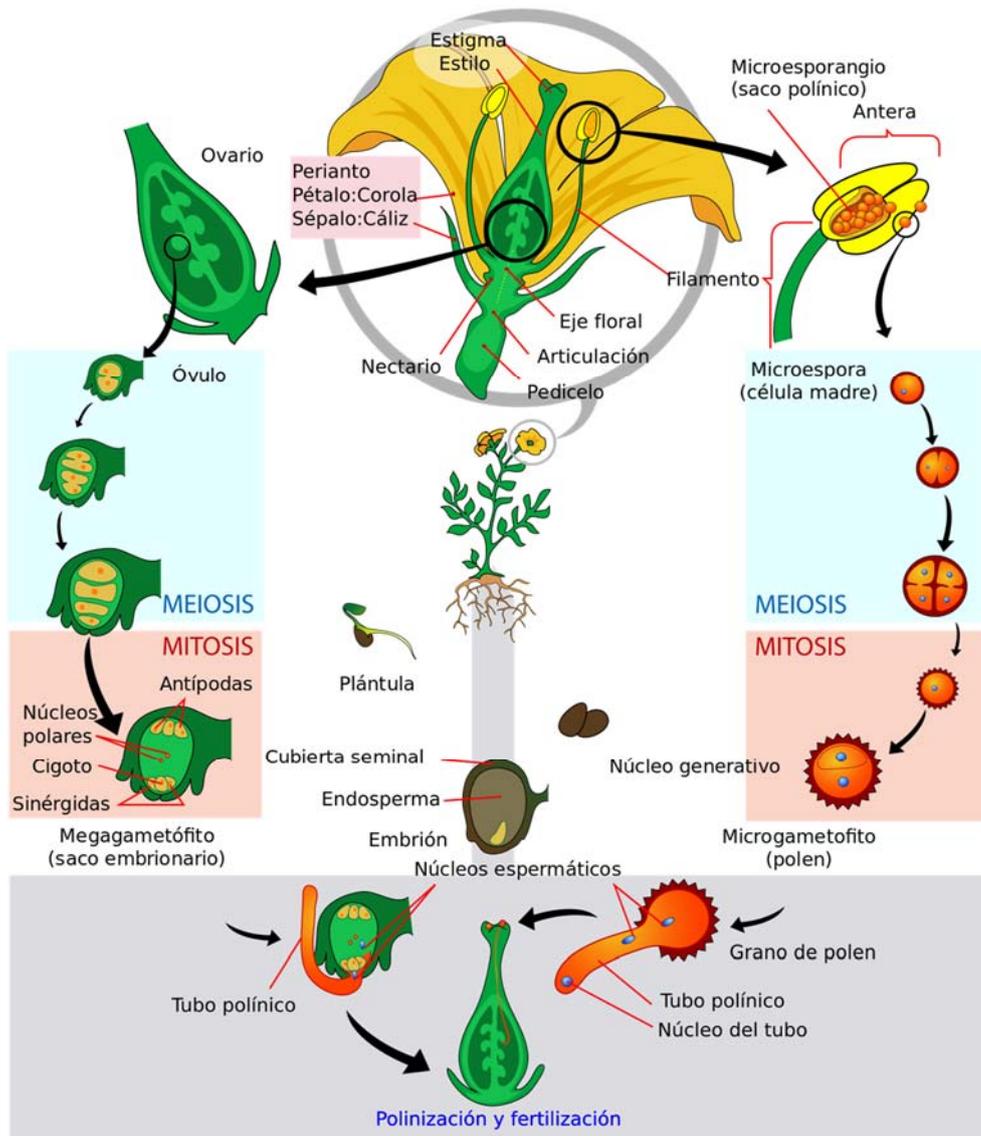


Figura 5. Ilustración del proceso de polinización y fecundación en plantas superiores. (La imagen ha sido liberada al dominio público por su autor. Ver en https://es.wikipedia.org/wiki/Tubo_pol%C3%ADnico#/media/File:Angiosperm_life_cycle_diagram-es.svg).

1.2.2. Fases del desarrollo del fruto

Tras el establecimiento de la arquitectura de la flor y la formación de los gametos, el desarrollo del fruto depende del éxito de la polinización y la fecundación (Gillaspi et al, 1993). La fecundación del óvulo permite que el ovario reanude su crecimiento y experimente diversos cambios metabólicos para dar lugar a un fruto. El fruto es, por tanto, la consecuencia de la transformación de un ovario, es decir, el septo se desarrolla a partir de la fusión de dos paredes adyacentes de carpelos (Lemaire-Chamley et al, 2005), la pared del ovario se convierte en pericarpio de fruto y los óvulos fertilizados por el polen dan lugar a

semillas, cuya testa deriva del tegumento que rodea inicialmente el óvulo (Smith, 1935; Gillaspay et al, 1993; Chamarro, 1995; Ohad et al, 1996) (figura 6).

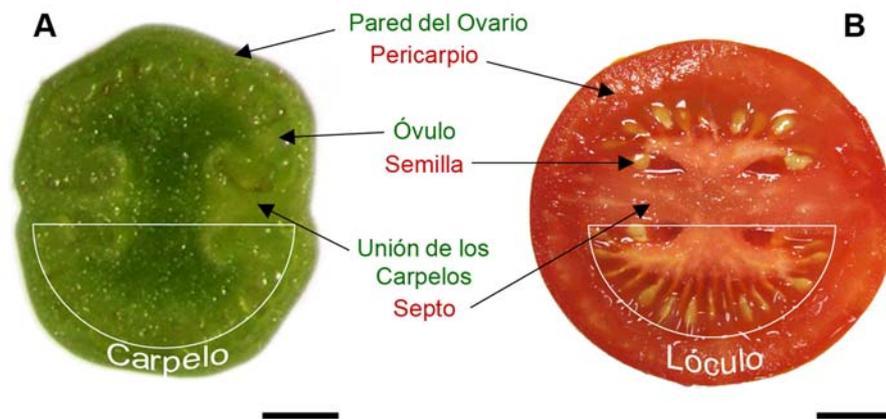


Figura 6. Secciones transversales de un ovario (A) y un fruto (B) de tomate. Escala de barras: 0,5 mm (A) y 1 cm (B).

Según Srivastava y Handa (2005), el desarrollo del fruto de tomate se divide en cuatro fases que incluyen las etapas de pre-polinización, polinización, fertilización y cuajado, post-cuajado o desarrollo temprano, maduración y senescencia. En la fase I ocurre el desarrollo floral, la polinización, la fertilización (o fecundación) y el cuajado del fruto. Este último está relacionado con la decisión de seguir con el desarrollo del ovario (en fruto), o abortar en caso de que no se produzca la fecundación. A lo largo de la fase I, el primordio reproductivo se diferencia en un carpelo completamente desarrollado. Se trata de un periodo mitóticamente activo que termina temporalmente cuando la flor alcanza el estadio de antesis (figura 7).

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

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

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

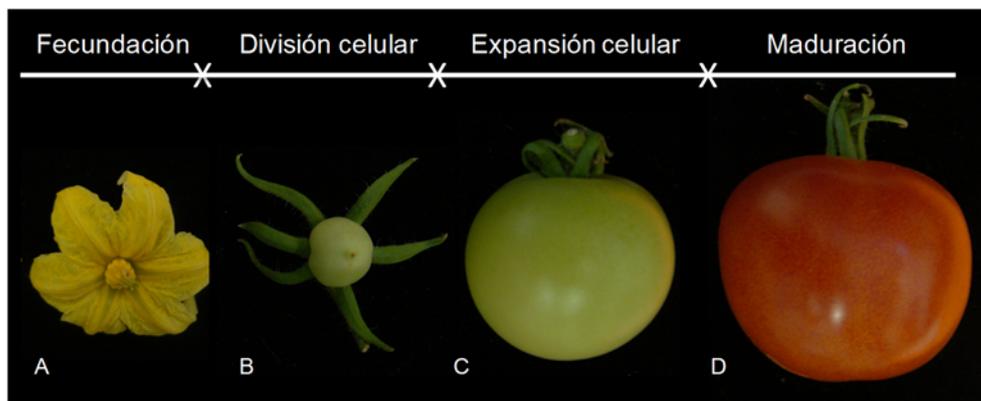


Figura 7. Cuajado y desarrollo del fruto de tomate. Se ilustra con una foto representativa cada una de las 4 fases del desarrollo del fruto: fase I (A), fase II (B), fase III (C) y fase IV (D).

En la fase IV acontecen procesos de maduración y senescencia. Al inicio de esta fase la semilla se encuentra completamente desarrollada, y el fruto pierde la función de protección pasando a ser un agente de dispersión. Por otro lado, durante esta fase se producen profundos cambios metabólicos. En el caso del tomate, al tratarse de un fruto de tipo carnoso, se producen numerosos cambios fisiológicos que afectan a las características visuales (i.e. color), textura, sabor y aroma, haciendo que el fruto sea más atractivo para el consumidor final (Bartley e Ishida, 2003). Por lo que respecta al color, al inicio de la fase IV el fruto se encuentra en el estadio pintón, momento en el que se aprecia que el fruto ya no es completamente verde, sino que empiezan a aparecer tonalidades rojizas. A continuación, el fruto exhibe un tono anaranjado y finalmente adquiere el típico color rojo cadmio (figura 7).

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

1.2.3. Componentes genéticos y hormonales relacionados con la transición de ovario a fruto

El cuajado representa la transición desde el ovario a un fruto en desarrollo con capacidad para convertirse en un órgano maduro que garantiza la protección y dispersión de la semilla. Como se comentaba en el párrafo anterior, el cuajado del fruto depende del éxito de la polinización y la fecundación (Gillaspi et al, 1993). Según Fuentes y Vivian-Smith (2009), la fecundación promueve el desarrollo de la semilla, anula la represión de la división celular y desencadena la transición de ovario a fruto de manera sincronizada. En ausencia de polinización y fecundación, el crecimiento del ovario se detiene, la flor experimenta procesos de senescencia y finalmente se desprende de la planta (Medina, 2010), lo que tiene sentido desde un punto de vista adaptativo toda vez que la función biológica del fruto gira en torno a la formación y dispersión de la semilla. Por tanto, el fruto no tiene *a priori* razón de ser sin la formación de semillas. Con todo, aunque los ovarios de tomate no son capaces de desarrollarse en ausencia de polinización y fecundación, en algunas variedades se desarrollan frutos sin que ocurran estos eventos a través de un proceso denominado partenocarpia (Ho y Hewitt, 1986). De esta forma, se desarrollan frutos que carecen de semilla.

El cuajado de fruto se atribuye tradicionalmente a la acción de tres fitohormonas: auxinas, giberelinas (GAs) y citoquininas (Mariotti et al, 2011). En frutos normales, los niveles de estas hormonas aumentan tanto en el fruto como en la semilla (Nitsch, 1950; Blumenfeld y Gazit, 1970; Varga y Bruinsma, 1976; García-Martínez et al, 1991; Yang et al, 2002; Devoghalaere et al, 2012). Se ha propuesto como hipótesis que la semilla se comunica a través de estas hormonas con los tejidos que la envuelven para promover el crecimiento del fruto (Ozga et al, 2002). En el proceso de la partenocarpia, los mecanismos fisiológicos que desencadenan el crecimiento del fruto no son totalmente conocidos. Sin embargo, se sabe que un desequilibrio hormonal en los niveles de auxinas, GAs y citoquininas puede conducir a la partenocarpia (Gorguet et al, 2005). Por ejemplo, tratamientos artificiales de flores de tomate con auxinas o GAs exógenas promueven el desarrollo de frutos partenocárpico. Aunque ambas hormonas son capaces de desencadenar el desarrollo partenocárpico del fruto, parece que actúan por rutas distintas activando mecanismos celulares diferentes. Así, los frutos inducidos por auxinas tienen más células en comparación con los frutos inducidos por GAs, cuyas células son de mayor calibre (Bungerkibler y Bangerth,

1983). Aun así, los resultados de diversas investigaciones indican que ambas hormonas deben interactuar de manera coordinada para regular el cuajado del fruto (Serrani et al, 2008; Vriezen et al, 2008; Dorcey et al, 2009). Por ejemplo, se ha observado que la aplicación de inhibidores de GAs tiene un efecto negativo sobre el desarrollo partenocárpico de frutos de tomate tras un tratamiento con auxinas, lo que indica que la partenocarpia inducida por auxinas depende, al menos en parte, de la activación del metabolismo de GAs (Serrani et al, 2008). Además, se ha comprobado que la polinización induce la acumulación de transcritos de la ruta de señalización de auxinas, pero esto no ocurre en frutos partenocárpicos de tomate tratados con giberelinas (Vriezen et al, 2008), lo que sugiere que las GAs deben actuar corriente abajo de la señalización de auxinas durante los primeros estadios del desarrollo del fruto (de Jong et al, 2009). En este contexto, la caracterización de mutantes partenocárpicos está siendo una herramienta muy útil para avanzar en el conocimiento de las bases moleculares y genéticas que promueven el cuajado del fruto (de Jong et al, 2009a; Carrera et al, 2012; Ruan et al, 2012).

1.2.3.1. Papel de las auxinas en el cuajado del fruto

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

En los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de los mecanismos moleculares relacionados con la señalización de auxinas. Los genes *IAA*, miembros de la familia génica de reguladores transcripcionales *Aux/IAA*, actúan como represores transcripcionales de la ruta de señalización de auxinas (Reed, 2001; Wang et al, 2005). Otros componentes importantes de la ruta de señalización de auxinas son los factores de respuesta a auxinas (ARF, del inglés *Auxin Response Factor*), que controlan de manera específica las

respuestas biológicas dependientes de auxinas y promueven el inicio del desarrollo del fruto. Antes de la polinización (en ausencia de auxinas), las proteínas Aux/IAA se unen a factores ARF, de forma que el heterodímero ARF-Aux/IAA reprime la transcripción de genes de respuesta a auxinas (Guilfoyle y Hagen, 2007). Tras la polinización o un tratamiento con auxinas, las proteínas Aux/IAA son degradadas por el proteosoma 26S y las proteínas ARF quedan liberadas del efecto represivo de las Aux/IAA, permitiendo la activación de genes de respuesta a auxinas (figura 8). Los modelos actuales sugieren que la auxina promueve ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA a través del complejo SCF (Skp1/Cullin/F-box). Wang et al (2005) comprobaron que la reducción de transcritos de *IAA9* genera fenotipos pleiotrópicos caracterizados por el desarrollo de hojas simples en vez de compuestas o cuajado de fruto en estadios previos a la antesis. Estos fenotipos junto con ensayos de respuesta a aplicaciones de auxina permitieron determinar que la ausencia de expresión de *IAA9* conduce a hipersensibilidad a auxinas, sugiriendo que *IAA9* actúa como un represor transcripcional de la señalización de auxinas.

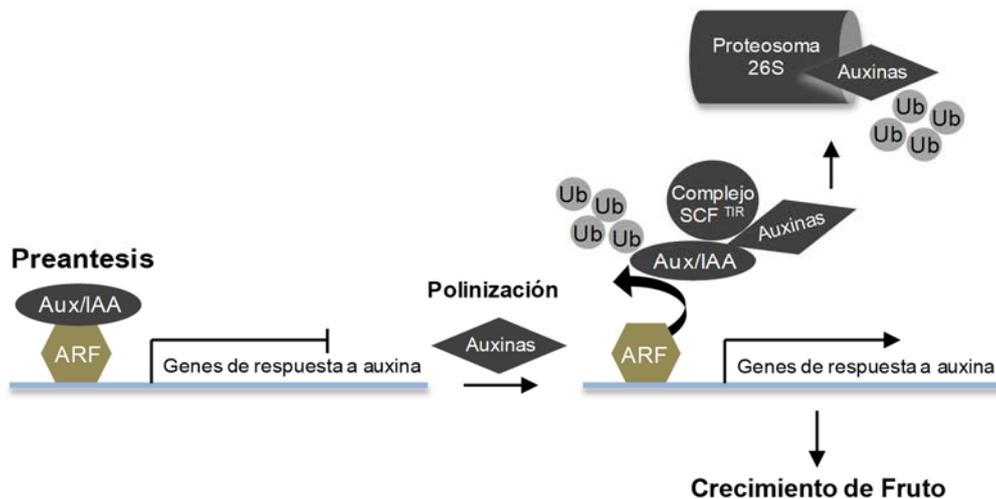


Figura 8. Mecanismo molecular de represión/activación de genes de respuesta a auxinas (adaptado de Pandolfini et al, 2007). En pre-antesis, las proteínas Aux/IAA forman heterodímeros con los factores de respuesta a auxinas ARF reprimiendo la transcripción de genes de respuesta a auxinas y, por ende, el crecimiento del ovario. La fecundación de los óvulos conduce a un incremento de la concentración de auxinas. Estas auxinas se unen a las proteínas Aux/IAA e interaccionan con el complejo SCF, lo que promueve la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA para su degradación por el proteosoma 26S. De esta forma, las proteínas ARF quedan libres de la represión y activan la expresión de genes de respuesta a auxinas. Ub= ubiquitina.

Uno de los miembros de la familia génica ARF en tomate, *SIARF7*, el ortólogo de *ARF7* de *Arabidopsis*, actúa como un regulador negativo del cuajado de fruto (de Jong et al, 2009, 2011). En efecto, los niveles de mensajero de *SIARF7* son elevados en tejido de placenta de flores maduras pero disminuyen rápidamente tras la polinización. Además, el descenso de los niveles de mensajero de *SIARF7* mediante interferencia de RNA conduce al desarrollo de frutos partenocárpicos en las plantas transgénicas. Los frutos partenocárpicos de estas plantas transgénicas exhiben características típicas relacionadas con elevados niveles de auxinas y giberelinas, lo que indica que este gen podría estar implicado en la interacción entre estas dos hormonas (de Jones et al, 2009). Los resultados obtenidos por de Jong et al (2011) corroboran esta hipótesis e indican que *SIARF7* controla las respuestas a auxinas y giberelinas durante el inicio y desarrollo del fruto de tomate.

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

Sobre la base de los resultados expuestos en el párrafo anterior, se han sugerido dos modelos para tratar de explicar las funciones de *SIARF7* y *AtARF8*. El primer modelo está basado en los descubrimientos de Goetz et al (2007) quienes sugirieron que *ARF8* forma un complejo junto con proteínas Aux/IAA, posiblemente IAA9, que reprime la transcripción de genes de respuesta a auxina. Alternativamente, el complejo inhibitorio podría actuar indirectamente previniendo la unión de *ARF8* al promotor de genes de respuesta a auxinas. Tras la polinización y fertilización, la auxina desencadenaría la degradación de las proteínas Aux/IAA y, de esta forma, *ARF8* junto con otros activadores estimularía la expresión de genes de respuesta temprana a auxinas iniciando el crecimiento del fruto (figura 9).

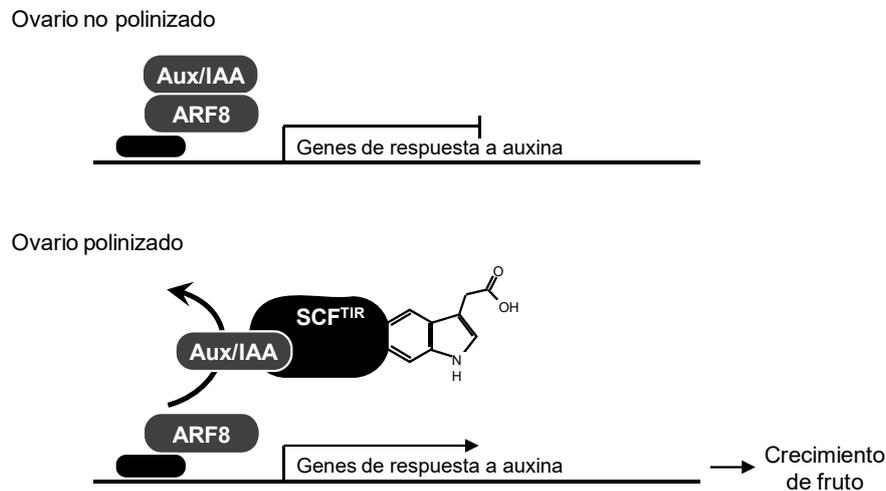


Figura 9. Modelo aceptado como vía de regulación de los genes de respuesta a auxina por medio de proteínas ARFs y Aux/IAA. Antes de la polinización, la actividad de *ARF8* se encuentra inhibida en un complejo proteico con Aux/IAA reprimiendo tanto la actividad de genes de respuesta a auxina como el crecimiento del fruto. Tras la polinización, el nivel de auxina incrementa produciéndose rápidamente la degradación de las proteínas Aux/IAA a través de la ruta ubiquitina/proteosoma 26S. Esta degradación dejaría libre a *ARF8* que activaría la transcripción de genes de respuesta a auxina y, como consecuencia, el crecimiento del fruto (de Jong et al, 2009).

El segundo modelo sugiere que *SIARF7* actuaría como un activador transcripcional de genes que atenuarían la respuesta a auxinas en ovarios no polinizados, lo que reprimiría las rutas de señalización de auxinas y giberelinas que son necesarias para el inicio del crecimiento del fruto. La reducción del nivel de transcrito de *SIARF7* tras la polinización, a través de proteínas Aux/IAA (i.e. IAA9), inhibiría la expresión de los genes represores de la respuesta a auxinas promoviendo el inicio del crecimiento del fruto (figura 10).

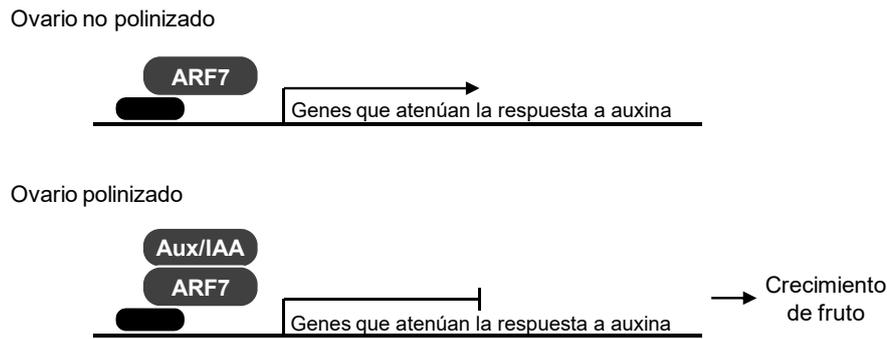


Figura 10. Modelo que propone que *ARF7* activaría la expresión de genes que reprimen la respuesta a auxinas y, por tanto, el cuajado de fruto. Tras la polinización, los niveles de transcrito de *ARF7* disminuirían y la actividad de las proteínas ARF7, aún presentes, podría ser inhibida por proteínas Aux/IAA inducidas por auxinas, como por ejemplo IAA9 (de Jong et al, 2009).

En *Arabidopsis*, la familia de proteínas de unión a auxinas F-box (ABF por *auxin-binding f-box protein*) y *TIR1* (*transport inhibitor response protein 1*) tienen funciones duales, como receptores de auxinas y como subunidades F-box del complejo ubiquitina-ligasa (E3) que reconocen proteínas Aux/IAA y las localizan para su degradación a través de la ruta del proteosoma 26S (Mockaitis y Estelle, 2008). El supuesto ortólogo de *TIR1* en tomate (*SITIR1*) también está involucrado en la ruta de señalización de auxinas. Así, las plantas que sobre-expresan *SITIR1* desarrollan hojas con un menor grado de complejidad y frutos partenocárpicos, lo que sugiere que *SITIR1* podría ser un regulador positivo de la señalización de auxinas (Ren et al, 2011). La identificación de genes asociados a la señalización de auxinas ha permitido clarificar el mecanismo a través del cual se induce partenocarpia en el fruto de tomate. Por ejemplo, en el caso de *SIIAA9*, comentado anteriormente, antes de la polinización y en ausencia de inducción por auxinas, la proteína IAA9 se une a una proteína ARF formando un complejo heterodimérico que inhibe la ruta de señalización de auxinas corriente abajo. Tras la polinización, el receptor *SITIR1* percibe un aumento de auxinas en el ovario y el complejo ubiquitina-ligasa SCF^{SITIR1} cataliza la poliubiquitinación de *SIIAA9* promoviendo su degradación a través de la ruta del proteosoma 26S. De esta forma, los factores ARF libres se unen a las regiones promotoras de genes de respuesta a auxina (de Jong et al, 2009).

El gen *AUCSIA* (del inglés *AUxin Cum Silencing Action*) se identificó mediante el análisis comparativo de la expresión génica en botones florales de líneas de tomate que expresaban la construcción *DefH9-iaaM*¹ y de líneas WT

¹ Las plantas transgénicas *DefH9-iaaM* desarrollan frutos partenocárpicos.

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

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

1.2.3.2. Papel de las giberelinas en el cuajado del fruto

Las giberelinas (GAs) intervienen en diversos aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la elongación del tallo, la germinación de la semilla, la transición floral y la fertilidad (Finkelstein et al, 2008; Sun y Gubler, 2004). La biosíntesis de GAs se produce a través de diferentes pasos catalizados por enzimas que tienen una localización subcelular distinta. A pesar de su complejidad, la biosíntesis se puede resumir en dos rutas: i) la ruta de la '13 no hidroxilación', en la que se sintetiza GA_9 a partir de GA_{12} , y ii) la ruta de la '13 hidroxilación' en la que se sintetiza GA_{20} a partir de GA_{12} ; ambas catalizadas a través del enzima $GA_{20}ox$. Posteriormente, la oxidación de GA_9 y GA_{20} a través de GA 3-oxidasa ($GA_{3}oxs$) da lugar a GA_4 y GA_1 . Alternativamente, GA_9 y GA_{20} pueden dar lugar a GA_7 y GA_3 (Hedden y Phillips, 2000). GA_1 , GA_3 , GA_4 y GA_7 son las únicas GAs biológicamente activas; las demás son mayoritariamente intermediarios de la ruta o productos del catabolismo (figura 11). El balance de

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

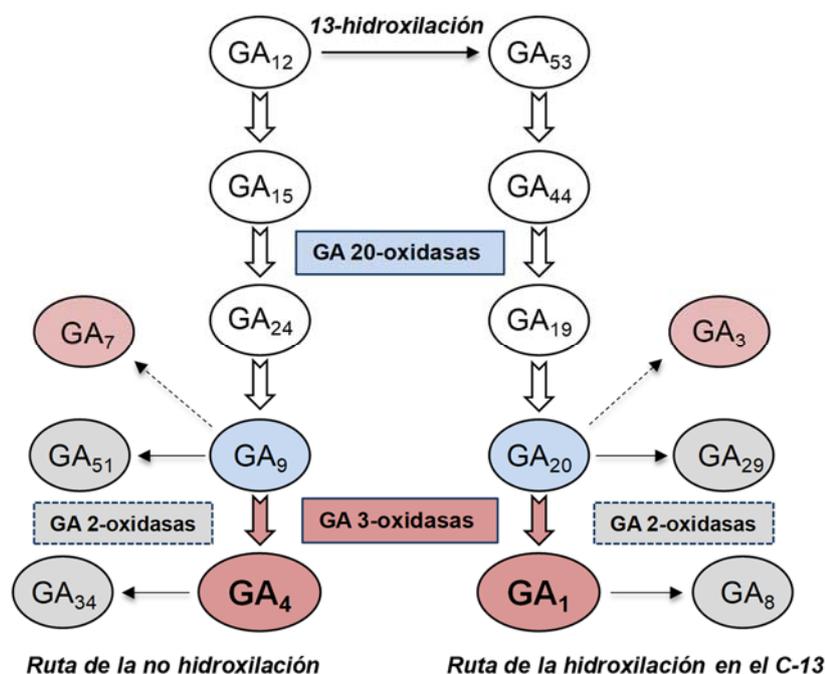


Figura 11. Esquema de las rutas de la no hidroxilación y de la hidroxilación en el C-13. GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇ son GAs bioactivas mientras que GA₈, GA₂₉, GA₃₄ y GA₅₁ son GAs inactivas

Las flores jóvenes de tomate contienen los metabolitos de las dos rutas, cuyos niveles disminuyen a lo largo del desarrollo del ovario (Fos et al, 2000). Tras la polinización, el contenido total de giberelinas en el ovario aumenta pero se detectan bajos niveles de metabolitos de la ruta biosintética de la GA₄ (Bohner et al, 1988; Koshioka et al, 1994; Serrani et al, 2007). Estos resultados sugieren que la ruta de la '13 hidroxilación' es la que actúa durante el crecimiento del ovario (Fos et al, 2000). De hecho, la aplicación de las GA bioactivas GA₁ y GA₄ en ovarios emasculados de tomate ha permitido descubrir que GA₁ es un inductor más eficaz del cuajado de fruto que GA₄, en tanto que ésta última parece más determinante durante la germinación de la semilla (Serrani et al, 2007; Nakaune et al, 2012). Además, en ovarios polinizados se produce la acumulación de transcritos de GA20 oxidasa (GA20ox), al contrario de lo que ocurre en ovarios no polinizados (Serrani et al, 2007). Por el contrario, los transcritos de GA2ox (ruta catalítica de GAs) no difieren de manera significativa entre ovarios polinizados y no polinizados. Estos resultados sugieren que la biosíntesis de GA₁ en el ovario

podría ser un regulador clave de la transición al cuajado y que *GA20ox* sería el factor limitante en el control de la biosíntesis de GA_1 . Así, se ha visto que la sobreexpresión de *GA20ox* en tomate promueve el desarrollo de fruto en ausencia de polinización (García-Hurtado et al, 2012) y la partenocarpia del mutante de tomate *pat* ha sido atribuida a la expresión constitutiva de *GA20ox1* (Olimpieri et al, 2007). Estos resultados confirman el papel que desempeña la expresión de *GA20ox* en el cuajado del fruto.

La cascada de señales que se desencadena tras la percepción de GAs se conoce menos que su biosíntesis, aunque sistemas como la aleurona de los cereales y los mutantes de respuesta a GAs de *Arabidopsis* y arroz han permitido avanzar en el conocimiento del proceso de señalización de esta hormona (Olszewski et al, 2002). La señalización por GAs se basa en la degradación de proteínas. El descubrimiento de la función de las proteínas DELLA en la señalización de GAs ha permitido comprobar que el mecanismo de acción es similar al de otras vías de señalización de hormonas (i.e. auxinas, etileno o jasmonato). Las proteínas DELLA actúan como reguladores negativos de la respuesta a GAs y su degradación se lleva a cabo a través de la ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma 26S (Sun y Gubler, 2004). En este proceso cobra especial relevancia el complejo enzimático SCF (Skp1/cullin/F-box) ubiquitina-ligasa (E3) cuya subunidad F-box posee un dominio C-terminal que confiere la especificidad de unión al sustrato que se debe ubiquitinar (Thomas y Sun, 2004). En *Arabidopsis* se han identificado 5 miembros de la familia *DELLA* que poseen funciones parcialmente solapadas, mientras que en tomate sólo se conoce un gen *DELLA* (*PROCERA/SIDELLA*) (Bassel et al, 2004; 2008). El silenciamiento de *PROCERA/SIDELLA* promueve efectos pleiotrópicos en las plantas transgénicas, lo que incluye mayor elongación del tallo, elongación del estilo, así como el desarrollo de frutos partenocárpicos que exhiben características similares a los que se obtienen mediante tratamientos con giberelinas (Marti et al, 2007). Esto quiere decir que menores niveles de expresión de *SIDELLA* permitirían activar la ruta de señalización de giberelinas tal y como ocurre después de la polinización y fecundación del ovario. Así, *SIDELLA* actuaría como un regulador negativo del cuajado de fruto en tomate al restringir la señal de giberelinas y prevenir el crecimiento del ovario antes de que se produzca la polinización y fecundación. Los frutos partenocárpicos de las plantas que tienen silenciado el gen *PROCERA/SIDELLA* son más pequeños, tienen células alargadas y un menor número de células en el pericarpio. Estos resultados

podrían estar indicando que las células de los frutos de estas plantas sólo han experimentado elongación celular pero no división celular regulada por auxinas. Acorde con lo anterior, la aplicación exógena de giberelinas induce partenocarpia sin alterar la expresión de genes implicados en la señalización de auxinas y el número de capas celulares del pericarpo es menor. En definitiva, los resultados obtenidos hasta la fecha ponen de manifiesto la importancia de la ruta de señalización de GAs sobre el cuajado del fruto (Serrani et al, 2008; Vriezen et al, 2008).

1.2.3.3. Papel de las citoquininas en el cuajado del fruto

Al igual que ocurre con las concentraciones de auxina y giberelina, los niveles de citoquinina aumentan en el ovario tras la polinización (Matsuo et al, 2012). Aunque se considera generalmente que las citoquininas juegan un papel crítico estimulando la división celular durante el desarrollo (Wismer et al, 1995; Srivastava y Handa, 2005), existen muy pocos datos acerca de la función de esta hormona en la fase inicial de división celular del fruto (Mariotti et al, 2011). Las citoquininas promueven la proliferación celular en los meristemos apicales e interactúan de manera coordinada con las auxinas (Murray et al, 2012). No se puede descartar por tanto que operen de manera similar en el gineceo en desarrollo (Lindsay et al, 2006; Bartrina et al, 2011). Estudios en *Arabidopsis* han demostrado que las citoquininas tienen al menos dos funciones durante el desarrollo del fruto: i) inducir la proliferación celular temprana en la región media del gineceo en desarrollo y ii) promover la formación de los márgenes de las valvas de la silicua (Marsch-Martinez et al, 2012).

Bohner et al (1988) observaron que la concentración de citoquinina aumenta cinco días después de la antesis, cuando la división celular es más activa, lo que sugiere que debe existir una correlación positiva entre las citoquininas y la división celular. De hecho, Bohner y Bangerth (1988) sugirieron que las citoquininas eran secretadas por las semillas en desarrollo para activar la división celular en los tejidos a su alrededor. El cuajado de fruto y el crecimiento durante las primeras etapas del desarrollo están asociados a mayores contenidos de auxina, giberelina y citoquinina (Mariotti et al, 2011). Según Srivastava y Handa (2005), la correlación entre el número de células y el nivel de citoquinina en frutos pequeños de tomate sugiere que esta hormona debe desempeñar un papel importante durante la fase de división celular (fase II, ver apartado 1.2.2). Los mayores niveles de citoquinina en ovarios de líneas que expresan específicamente el gen

ipt (que codifica la isopenteniltransferasa) promueven un incremento del contenido en sólidos solubles y mejoran la relación azúcar / ácido en fruto, aunque éstos son de menor calibre (Martineau et al, 1994). Este incremento en citoquininas mejora la tasa de cuajado de fruto, probablemente incrementando la fuerza sumidero del ovario (Srivastava y Handa, 2005). Así, la aplicación de citoquininas sintéticas sobre ovarios en estadio de pre-antesis es capaz de activar la división celular y conducir a la formación de frutos partenocárpicos (Matsuo et al, 2012). En un trabajo diferente se ha demostrado que la aplicación de citoquininas sintéticas induce partenocarpia a través de una modulación del metabolismo de las giberelinas y auxinas (Ding et al, 2013). Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que las citoquininas actúan como reguladores positivos del crecimiento del fruto.

1.2.3.4. Integración de los diferentes componentes implicados en el cuajado del fruto

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

La ruta de señalización de auxinas arbitra las respuestas a auxina promoviendo interacciones proteicas con varios factores clave. *SITR1* parece ser un regulador positivo de la señalización de auxinas, desactivando el represor de la respuesta a auxina *SIIAA9* (Ren et al, 2011). Por el contrario, *AUCSIA* y *SIARF7* actúan como reguladores negativos de la respuesta a auxinas. De hecho, algunos de los genes de respuesta a auxina pueden activar genes *Aux/IAA* para crear una retroalimentación negativa que ajuste la intensidad de la respuesta a auxina (de Jong et al, 2009). *SICHS* también podría ejercer represión sobre la respuesta a auxinas (Wasson et al, 2006).

Se sabe que la ruta de respuesta a giberelinas está estrechamente relacionada con la ruta de respuesta a auxinas. De hecho, se ha demostrado que la auxina induce el cuajado de fruto incrementando la biosíntesis de giberelinas y parece que actúa corriente arriba de las GAs (Serrani et al, 2008; Vriezen et al,

2008). Conviene indicar que la ruta de señalización de las giberelinas también está sujeta a una retroalimentación positiva. En este sentido, las giberelinas estimulan la degradación de las proteínas DELLA, que son represores de la señalización de las giberelinas (Bassel et al, 2008). Conviene recordar también que los mutantes *pat* tienen alterada la ruta de señalización de las GAs, aunque aún se desconocen los mecanismos moleculares que conducen a la formación de frutos partenocárpicos en estos mutantes.

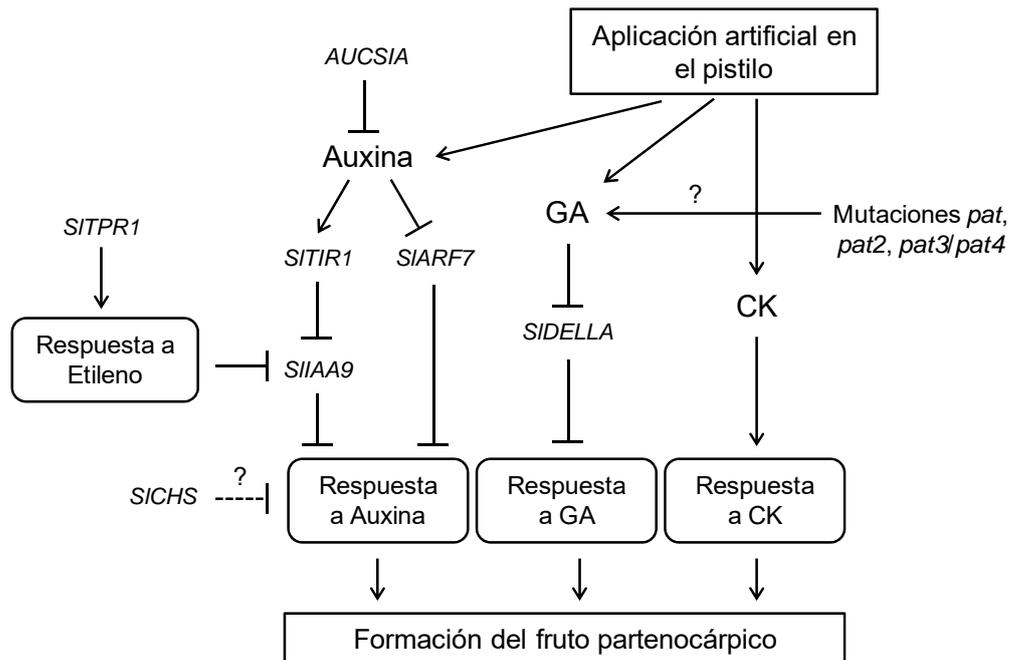


Figura 12. Modelo sobre la regulación del desarrollo del fruto partenocárpico a través de las rutas de señalización hormonal (adaptado de Ariizumi et al, 2013). La partenocarpia se debe a la acción de diversos componentes implicados en las rutas de señalización de varias hormonas, en particular etileno,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

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

Citoquininas, etileno y ácido abscísico también desempeñan un papel importante en el cuajado del fruto, interactuando con auxinas y giberelinas. Las citoquininas son reguladores positivos del crecimiento del fruto y podrían mediar en la ruta de las giberelinas (Sun et al, 2004). El etileno podría regular el crecimiento del ovario modulando la transcripción de genes relacionados con auxinas, como *SIIAA9* (Vriezen et al, 2008; Wang et al, 2009), o interviniendo en

la biosíntesis de giberelinas (Shinozaki et al, 2015). El ácido abscísico contribuiría en esta red de regulación manteniendo el estado latente de los ovarios y actuando como un antagonista de las GAs y de las auxinas (Pascual et al, 2009).

1.2.3.5. Quinasas dependientes de ciclina y cuajado del fruto

En eucariotas, el ciclo celular se compone de cuatro fases distintas: una fase de pre-síntesis de ADN denominada fase G1, la fase S durante la cual se sintetiza ADN, una fase post-sintética de ADN denominada fase G2, y la fase M o fase mitótica. Los componentes fundamentales del sistema de control del ciclo celular son miembros de una familia de proteínas denominadas quinasas dependientes de ciclina (CDK de inglés *Cyclin-Dependent Kinases*). Las CDK están implicadas en la regulación de los procesos de división celular de diferentes organismos eucariotas (Srivastava y Handa, 2005). La actividad quinasa de las CDK depende del estado de fosforilación / desfosforilación de la quinasa, de la unión a las ciclinas y de factores reguladores o inhibidores (Lees, 1995). Basándose en alineamientos de secuencias múltiples entre las CDK identificadas en plantas, se han definido cinco familias de CDK (A – F), aunque los miembros más destacados y numerosos se encuentran en las clases CDKA y CDKB (Joubès et al, 1999; 2000). La familia CDKA reagrupa homólogos funcionales de la proteína de levadura p34^{cdc2/CDC28} y se caracteriza por la presencia del motivo PSTAIRE, esencial para la unión a la ciclina. Las proteínas CDKA están presentes en diferentes organismos y constituyen la clase más importante. Los genes *CDKA* regulan la progresión desde la fase G1 a la fase S y desde la G2 a la fase M (Mironov et al, 1999). Por lo que respecta a las proteínas CDKB, presentan características únicas y representan ejemplos de quinasas mitóticas con funciones específicas durante el inicio o la progresión a través de la fase M del ciclo celular (Burssens et al, 1998). Según Cížková et al (2008), sólo están presentes en células vegetales y en levaduras en gemación.

Los análisis realizados en *Arabidopsis* han indicado que *CDKA;1* es un gen clave tanto en la generación esporofítica como en la gametofítica. Así, las plantas homocigóticas para la mutación *cdka;1* no son viables y mueren en el estadio embrionario. En la generación gametofítica (desarrollo del gametofito masculino), la ausencia de función de *CDKA;1* ocasiona la detención del ciclo celular en la fase G2 previa a la división mitótica (Iwakawa et al, 2006).

El ovario de tomate detiene su crecimiento y entra en un estado de latencia poco antes de la antesis (Vriezen et al, 2008). El crecimiento se reanuda solo

después de que se produzca con éxito la polinización y la fertilización de los óvulos, a través de un período de intensa actividad mitótica de acuerdo con un patrón de división celular organizado (Azzi et al, 2015). Los genes de tomate de la familia *CDKA* se expresan con intensidad desde el estadio de antesis hasta los 5 días posteriores a la antesis (Joubès et al, 1999). A partir de los 10 días post-antesis hasta el inicio de la maduración, los niveles de expresión de *CDKA* disminuyen constantemente. Estos resultados sugieren que la expresión de *CDKA* es esencial para que se reanude el crecimiento del ovario tras la polinización y la fertilización de los óvulos. Además, *CDKA* se expresa activamente en tejidos jóvenes que exhiben una intensa división celular. Recientemente se ha reportado el efecto del silenciamiento y la sobre-expresión de *CDKA1* en tomate (Czerednik et al, 2012; 2015). Las plantas con el gen *CDKA1* silenciado producen frutos de menor calibre y con un pericarpio más delgado consecuencia de un menor número de capas celulares en el exocarpo (Czerednik et al, 2012). Las plantas que sobre-expresan este gen desarrollan frutos que son indistinguibles a los del WT, es decir, tienen similar peso y diámetro. Sin embargo, tienen una placenta más grande, un pericarpio más grueso y un número reducido de semillas. En la placenta y en el pericarpio aumentan significativamente tanto el número de capas celulares como el número de células por mm². Sin embargo, el tamaño medio de las células del pericarpio es menor y descienden los niveles de endorreducción en células del mesocarpo, placenta y mucílago. Según Czerednik et al (2014), la sobre-expresión de *CDKA1* induce mitosis a lo largo del pericarpio, altera los índices de endorreducción y reduce la formación de semillas en frutos en desarrollo. Esta menor cantidad de semillas tiene efectos indirectos sobre la expansión de las células del pericarpio, ya que las hormonas producidas por las semillas promueven la expansión de las células del fruto.

Vriezen et al (2007) observaron que diferentes genes implicados en el control del ciclo celular aumentaban dramáticamente su expresión tras la polinización del ovario o el tratamiento con giberelinas. Wang et al (2009) también observaron que genes del ciclo celular se encontraban regulados al alza en flores WT en post-antesis. Sin embargo, en las líneas transgénicas que tenían silenciado el represor de la respuesta a auxina *SIIAA9*, en las que se producía un cuajado prematuro del ovario en ausencia de polinización, la activación de los genes del ciclo celular ocurría antes, en concreto en el estadio de antesis. Resultados similares se han observado en otras especies (i.e. *Cucumis sativus* L. y *Malus x domestica* Borkh.), en las que los niveles de *CDK* aumentan

significativamente durante la fase de producción celular del desarrollo del fruto (Fu et al, 2008; Malladi y Johnson, 2011). En conjunto, los resultados sugieren que los genes *CDK* desempeñan un papel fundamental en la regulación de la actividad mitótica y el crecimiento exponencial del fruto tras el cuajado.

1.2.4. Componentes genéticos y hormonales relacionados con la maduración del fruto

La maduración es un carácter que sólo se produce en frutos y que se inicia una vez que las semillas han culminado su desarrollo (Guillaspy et al, 1993). El fruto de tomate es climatérico, lo que quiere decir que requiere de etileno para poder madurar. Este requerimiento ha convertido también al tomate en un excelente modelo para el estudio de los procesos que rigen la síntesis y percepción de etileno (Klee y Giovannoni, 2011). La síntesis autocatalítica de etileno es el principal determinante de los cambios fenotípicos que alteran el color, textura, aroma y susceptibilidad a patógenos en el fruto. Por ello, se ha dedicado mucho esfuerzo para identificar los genes implicados en la regulación dependiente de etileno, principalmente los relacionados con la biosíntesis, percepción y señalización de esta hormona. Hoy en día se conoce la mayor parte de los genes principales que controlan la regulación dependiente de etileno.

1.2.4.1. Regulación de la síntesis de etileno durante el desarrollo del fruto

El etileno es la más simple de las hormonas vegetales, con sólo dos carbonos y cuatro hidrógenos. Aún así, se trata de una importante hormona que media en aspectos relacionados con la respuesta de las plantas a estreses de tipo biótico y abiótico. Además, el etileno interviene en ciertos procesos del desarrollo, especialmente en los relacionados con la maduración del fruto, así como en la abscisión de órganos. Como cabe esperar de una hormona tan importante, la síntesis de etileno se encuentra estrictamente regulada. La ruta biosintética es muy simple y está compuesta por tan sólo dos enzimas. La síntesis se inicia a partir de S-adenosilmetionina. La etapa limitante de la ruta es la síntesis de ácido-1-aminociclopropano-carboxílico (ACC), catalizado por la ACC sintasa (ACS). La última etapa de la vía la cataliza una oxidasa, ACC oxidasa (ACO), que requiere oxígeno como sustrato. Normalmente, ACO no es limitante para la síntesis de etileno ya que, aunque se induce durante la maduración, ACO está presente antes de que se inicie la maduración. El principal punto de regulación de la síntesis de etileno se produce durante la transcripción de ACS (Rottmann et al, 1991; Nakatsuka et al, 1998; Barry y Giovannoni, 2006). Así pues, se ha

comprobado que durante la maduración, la expresión de *LeACS2* y *LeACS4* aumenta significativamente. Utilizando una construcción en antisentido, Oeller et al (1991) demostraron que la anulación de la expresión de *LeACS2* resultaba muy efectiva a la hora de inhibir la maduración del fruto. Recientemente se ha descubierto otro punto de regulación ACS a través del cual el enzima *LeACS2* se estabilizaría mediante fosforilación y se degradaría tras la desfosforilación (Kamiyoshihara et al, 2010). El nivel de proteína *LeACS2* influiría sobre la actividad ACS, el contenido de ACC y la producción de etileno en tejidos del fruto. Conviene indicar que existen al menos ocho genes ACS caracterizados en tomate y, como mínimo, se han identificado tres más en la secuencia del genoma del tomate. Cada uno de ellos tiene un patrón de expresión distintivo de tejido y una especificidad de estímulo (Klee y Giovannoni, 2011). Por lo que respecta a ACO, existen cuatro genes caracterizados y se han encontrado tres adicionales en la secuencia del genoma del tomate. A pesar de que la actividad ACO no es limitante, el etileno induce la expresión de ciertos genes ACO, en especial en frutos en estadio de maduración (Barry et al, 1996).

1.2.4.2. La ruta de señalización de etileno en tomate

A) Receptores de etileno

Los receptores de etileno en plantas son proteínas de membrana asociadas al retículo endoplasmático con actividad de proteína kinasa (Gamble et al, 1998; Moussatche y Klee, 2004). Los análisis genéticos realizados en *Arabidopsis* y tomate han demostrado que los receptores actúan como reguladores negativos de la ruta de respuesta a etileno (Hua y Meyerowitz, 1998; Tieman et al, 2000). En ausencia de la hormona, los receptores suprimen la respuesta a etileno mientras que en presencia de la misma, la supresión desaparece y tiene lugar la respuesta a etileno.

Uno de los receptores de etileno de tomate se identificó a partir del mutante *Never-ripe (Nr)*. Se trata de la única mutación en un receptor de etileno que da lugar a un fenotipo observable confiriendo una insensibilidad dominante a etileno. Los frutos del mutante *Nr* no maduran, incluso exponiéndolos a etileno. Además, la mutación confiere insensibilidad a etileno en todos los órganos de la planta (i.e. las flores no experimentan senescencia). La mutación es consecuencia de un cambio en un simple aminoácido en el gen *NR* (Lanahan et al, 1994). *NR* (*Le-ETR3*) codifica una proteína homóloga al receptor de etileno de *Arabidopsis ETR1* (Wilkinson et al, 1995; Hackett et al, 2000).

En tomate existen siete receptores de etileno (*LeETR1*, *LeETR2*, *NR*, *LeETR4*, *LeETR5*, *LeETR6* y *LeETR7*) (Wilkinson et al, 1995; Zhou et al, 1996; Lashbrook et al, 1998; Tieman y Klee, 1999). El análisis de la secuencia del genoma del tomate parece indicar que éste es el repertorio completo de receptores de etileno en tomate. Se sabe que cinco de estos receptores se unen a etileno mientras que dos de ellos (*LeETR6* y *LeETR7*) no han sido por el momento caracterizados a este nivel (O'Malley et al, 2005). Los receptores de etileno se dividen en dos subfamilias (subfamilia 1 y subfamilia 2) sobre la base de las estructuras de los genes y las proteínas. Los miembros de la subfamilia 1 tienen una elevada similitud con histidinas kinasas, mientras que los de la subfamilia 2 han divergido adquiriendo actividad serina kinasa (Moussatche y Klee, 2004).

En *Arabidopsis*, los análisis funcionales han indicado que la pérdida de función en alguno de los receptores de etileno no tiene efectos importantes en la respuesta a etileno, lo que indica que existe un alto grado de redundancia funcional. Con todo, los miembros de la subfamilia 1 son más importantes en la ruta de señalización de etileno y no pueden ser reemplazados funcionalmente por miembros de la subfamilia 2 (Wang et al, 2003). En tomate, sin embargo, los receptores funcionan de forma muy diferente. La reducción de la expresión de cualquiera de los genes de la subfamilia 2, *LeETR4* o *LeETR6*, da lugar a un incremento de la sensibilidad a etileno. En efecto, las plantas antisentido con menor nivel de expresión de *LeETR4* o *LeETR6* exhiben fenotipos que son consistentes con una respuesta constitutiva de etileno, lo que incluye la maduración temprana del fruto (Tieman et al, 2000; Kevani et al, 2007). Esta mayor sensibilidad a etileno puede ser restaurada mediante sobre-expresión del receptor de la subfamilia 1 *NR*. Se ha comprobado que los niveles de expresión de *LeETR4*, *LeETR6* y *NR* aumentan significativamente durante la maduración del fruto de tomate, siendo de largo los que más se expresan durante este proceso. La pérdida de función de cualquiera de los otros receptores no genera fenotipos de sensibilidad a etileno o de ausencia de maduración (Kevani et al, 2007). Los resultados parecen indicar que la función de los receptores de la subfamilia 2 es más importante en tomate que en *Arabidopsis*.

B) La familia CTR

Corriente abajo de los receptores de etileno se encuentra una familia de reguladores negativos (proteínas kinasas) de la respuesta a etileno codificada por

genes *CTR*. A diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis*, con sólo un gen *CTR* (*CTR1*), en tomate se han identificado cuatro genes *CTR* cuyas proteínas exhiben una elevada homología con la de *CTR1*. Tres de estos cuatro genes (*tCTR1*, *tCTR3* y *tCTR4*) pueden complementar funcionalmente el mutante *ctr1* de *Arabidopsis*, lo que indica un alto grado de redundancia funcional. Los análisis de expresión sugieren que *tCTR1* es el miembro de esta familia que exhibe el mayor nivel de expresión en fruto. También se ha comprobado que la presencia de etileno o el proceso de maduración del fruto incrementan significativamente los niveles de RNAm de *tCTR1*.

B) Factores de transcripción inducibles por etileno

Corriente abajo se encuentra una familia de factores de transcripción compuesta por 4 genes tipo *EIN3* (*Le-EIL1-LeEIL4*) (Tieman et al, 2001; Yokotani et al, 2003). Se ha demostrado que la anulación de función de *Le-EIL1*, *Le-EIL2* y *Le-EIL3* reduce significativamente la sensibilidad a etileno y cada uno de ellos es capaz de complementar al mutante de anulación de función de *Arabidopsis ein3*. Estos resultados parecen indicar que estos tres genes tienen una cierta redundancia funcional en tomate.

En *Arabidopsis*, los niveles de proteínas EIN3 están controlados por una familia de factores de unión a EIN3 (EBF) que las señalizan para que se produzca su degradación a través de la ruta ubiquitina/proteosoma 26S (Guo et al, 2003; Potuschak et al, 2003; Gagne et al, 2004). En tomate se han identificado dos genes *EBF*, *SIEBF1* y *SIEBF2* (Yang et al, 2010). Estos dos genes son funcionalmente redundantes y la reducción de sus niveles de expresión conduce a una respuesta constitutiva a etileno y un adelanto de la maduración. Estos resultados confirman que la estabilización de las proteínas LeEIL activa la señalización de etileno.

Al final de la cascada de señalización se encuentra la familia ERF (factores de respuesta a etileno), uno de los miembros de la amplia superfamilia AP2/ERF. Su expresión se activa a través de proteínas tipo EIN3 (EILs). En tomate se han descrito cinco genes pertenecientes a esta familia (*LeERF1*, *LeERF2*, *LeERF3*, *LeERF4* y *LeERF3b*) capaces de unirse a cajas box del tipo GCC de los genes regulados por etileno (Cara y Giovannoni, 2008). Teniendo en cuenta que se trata de una familia muy amplia, se asume que debe de existir un cierto grado de redundancia funcional. Hasta la fecha, no se le ha asignado una función específica a ningún miembro de esta familia (Klee y Giovannoni, 2011).

1.2.4.3. Los sistemas 1 y 2 que conducen a la transición de la maduración

El etileno tiene efectos diferentes en frutos de tomate dependiendo de su estadio de desarrollo. El tratamiento de frutos inmaduros con etileno trae consigo lo que ha venido a denominarse síntesis de etileno a través del sistema 1 (Yang, 1987), que se caracteriza por la inducción de genes regulados por etileno (Alba et al, 2005), síntesis auto-inhibitoria de etileno y fallo en el proceso de la maduración. En contraste, los frutos maduros se rigen por la síntesis de etileno a través del sistema 2, caracterizada por la inducción de un amplio y solapado juego de genes (Alba et al, 2005), síntesis autocatalítica de etileno y maduración. Además, el sistema 2 implica la inducción del gen inducible por etileno y asociado a la maduración *ACS2*, que conduce a la síntesis autocatalítica de etileno. Así pues, los frutos inmaduros y maduros responden a etileno a través de diferentes vías. A pesar de que el etileno no inicia la maduración en frutos inmaduros, precipita el comienzo de la maduración (Yang, 1987) de forma proporcional a la cantidad de etileno a la que está expuesta el fruto.

Alteraciones en la cascada de señalización de etileno pueden también influir en el tiempo de inicio de la maduración. La menor expresión de *LeETR4* o *LeETR6* incrementa la sensibilidad a etileno dando lugar a una maduración temprana de fruto (Kevany et al, 2007). De forma similar, la reducción de la expresión del gen *SIEBF* acelera el comienzo de la maduración, presumiblemente como consecuencia de la acumulación de *LeEIL* (Yang et al, 2010). El hecho de que los receptores actúen como reguladores negativos de la ruta de respuesta a etileno, unido a que la presencia de etileno desencadena la degradación de receptores, sugiere que los niveles de los receptores podrían ser críticos a la hora de modular el tiempo de maduración. Consistente con este modelo, se ha comprobado que el tratamiento de frutos inmaduros con etileno reduce la actividad de los receptores y promueve maduración temprana del fruto (Kevany et al, 2007).

1.2.4.4. Control transcripcional de la maduración del fruto

Los análisis moleculares relacionados con los procesos de síntesis de etileno y transducción de señal durante la maduración sugieren la existencia de sistemas reguladores adicionales que coordinen la irrupción y síntesis de etileno a lo largo del proceso. Los análisis fisiológicos y moleculares de mutantes de tomate que exhiben alteraciones en el proceso de la maduración parecen indicar defectos en esos sistemas que regulan la maduración. Por ejemplo, en los

mutantes no alélicos *ripening-inhibitor (rin)*, *nonripening (nor)* y *Colorless nonripening (Cnr)* se desarrollan frutos que no maduran incluso después de un tratamiento con etileno. Estos mutantes comparten una serie de características fisiológicas, como no producir etileno o no experimentar incremento de respiración climatérica (Vrebalov et al, 2002; Giovannoni et al, 2004; Manning et al, 2006), lo cual indica que los genes afectados *RIN*, *NOR* y *CNR* promueven maduración en el fruto a través de una ruta reguladora que actúa corriente arriba de la biosíntesis y señalización del etileno. Adicionalmente, los cambios de expresión de genes no regulados por etileno en los frutos de los mutantes *rin*, *nor* y *Cnr* (Giovannoni, 2007) indicarían que *RIN*, *NOR* y *CNR* podrían participar también en una ruta independiente de etileno.

El locus *rin* codifica un factor de transcripción MADS-box de tipo *SEPALLATA* que se induce cuando se inicia la maduración (Vrebalov et al, 2002). El gen *RIN* se encuentra en el cromosoma 5 adyacente al gen *MACROCLALYX (MC)*. Vrebalov et al (2002) descubrieron que la mutación *rin* estaba causada por una delección espontánea cuyo resultado era la expresión de un transcrito quimérico (RNAm *RIN/MC*) que anulaba la función de *RIN* y *MC*. La importancia de este gen en el proceso de maduración ha quedado demostrada tras la identificación de un homólogo de *RIN* en fresa, lo que indica que el control transcripcional de la maduración está conservado entre especies climatéricas y no climatéricas (Seymour et al, 2010).

El gen *NOR* codifica un factor de transcripción de tipo NAC (Giovannoni et al, 2004), mientras que *CNR* codifica un factor de transcripción de la familia *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN (SPBP)*, regulado, al menos en parte, por cambios en la metilación del promotor (Manning et al, 2006). La expresión de *CNR* se ve reducida en el mutante *rin*, lo cual sugiere que podría actuar corriente abajo del gen *RIN*. Las dianas de *SPBP* incluyen genes tipo MADS-box, como *TDR4*, el ortólogo de *FRUITFUL (FUL)* de *Arabidopsis*, cuya expresión se encuentra sustancialmente reducida en el mutante *Cnr*.

Aunque se han clonado los genes alterados en los mutantes de maduración de tomate bien caracterizados, existen algunos reguladores que aún no han sido identificados. Los análisis transcriptómicos indican que aún existen cientos de factores de transcripción que exhiben expresiones diferenciales durante el desarrollo del fruto, y muchos de ellos experimentan cambios de expresión durante la maduración (Alba et al, 2005). Algunos de ellos, como por ejemplo

LeHB-1, una proteína HD-zip que interactúa y es necesaria para la expresión de *ACO1*, pueden regular de forma específica el proceso de la maduración. Así pues, la represión de *LeHB-1* en plantas transgénicas de tomate da lugar a una menor expresión de *ACO1*, un concomitante descenso de la síntesis de etileno y retraso de la maduración (Lin et al, 2008).

Otro de estos reguladores es *TAGL1* (*Tomato AGAMOUS-Like 1*), un miembro MADS-box del clado AGAMOUS (AG) en el que también se encuentra *TAG1*. *TAGL1* se induce durante el desarrollo del carpelo y al inicio de la maduración (Busi et al, 2003). Se ha demostrado que la represión de *TAGL1* vía RNAi inhibe la maduración del fruto de tomate y reduce el grosor de su pericarpio (Vrebalov et al, 2009, Itkin et al, 2009; Giménez et al, 2010). Por otro lado, los ortólogos de *TAGL1* en *Arabidopsis* son los genes *SHATTERPROOF* (*SHP1* y *SHP2*) (Liljegren et al, 2000), que se han relacionado con el control de los mecanismos de dispersión de la semilla. Conviene recordar que los mecanismos de dispersión de semilla son diferentes en frutos secos y carnosos. En los frutos secos (i.e. *Arabidopsis*), tras la dehiscencia, la semilla se puede dispersar a través del viento, la lluvia o la piel de los animales. En los carnosos (i.e. tomate), los animales actúan como vectores de dispersión de la semilla tras consumir frutos que, por su succulencia, les resultan atractivos. El gen *TAGL1* podría representar en este contexto una especie de unión molecular entre ambos procesos de dispersión de semilla, a través del desarrollo de la carnosidad del fruto y subsiguiente maduración.

Según Pan et al (2010), *TAG1* es el gen más estrechamente relacionado con *TAGL1*. *TAG1* constituye el principal regulador del desarrollo de los carpelos de tomate (Pnueli et al, 1994) al igual que ocurre con *AG* en *Arabidopsis*. Sin embargo, durante la maduración, *TAG1* se induce y expresa cuando se reprime la *TAGL1*, lo que sugiere una función compensatoria durante este proceso (Vrebalov et al, 2009; Giménez et al, 2010). Además, el fenotipo que resulta de la expresión ectópica de ambos genes en plantas transgénicas es muy similar, caracterizado por el desarrollo de sépalos succulentos capaces de acumular carotenos (Pnueli et al, 1994a; Vrebalov et al, 2009; Itkin et al, 2009; Giménez et al, 2010). Conviene añadir que los dramáticos fenotipos de anulación de función de *TAG1* caracterizados por Pnueli et al (1994a), a saber, conversión homeótica del tercer verticilo de estambres en órganos petaloideos y del cuarto verticilo de carpelos en pseudocarpelos con meristemas florales indeterminados, podrían ser el reflejo de

una pérdida de función coordinada de diversos genes tipo *AGAMOUS*, toda vez que las plantas se obtuvieron mediante la tecnología antisentido (Pan et al, 2010). En definitiva, actualmente no se sabe con exactitud el papel específico que desempeña *TAG1* en el proceso de maduración. Para dar una respuesta a la función que desempeña este gen a lo largo del proceso sería necesario reprimir la expresión de *TAG1* específicamente durante la maduración del fruto de tomate (Klee y Giovannoni, 2011). Según estos últimos autores, es probable que se haya producido una diferenciación funcional en los genes del clado *AGAMOUS* (i.e. *TAG1*, *TAGL1*) entre *Arabidopsis* y tomate permitiéndoles promover funciones equivalentes en frutos de distinto tipo (Klee y Giovannoni, 2011).

Los reguladores transcripcionales descritos hasta este momento representan efectores positivos del proceso de maduración, de manera que su ausencia a través de mutaciones o intervención transgénica promueve fenotipos de ausencia de maduración. Recientemente, se ha demostrado que un miembro de la familia génica *APETALA2* (*AP2*), concretamente *SIAP2a*, actúa como regulador negativo de la maduración (Chung et al, 2010; Karlova et al, 2011). *SIAP2* es un miembro de la superfamilia *AP2/ERF* cuya represión da lugar a una maduración acelerada, producción elevada de etileno y acumulación alterada de carotenoides.

Klee y Giovannoni (2011) propusieron un modelo según el cual la expansión y diversificación de familias génicas consecuencia de eventos de poliploidización ha permitido que el tomate disponga de múltiples factores de transcripción implicados en el proceso de maduración de los frutos. Por un lado, se encontrarían reguladores como *RIN*, que han conservado a lo largo de la evolución funciones específicamente relacionadas con la maduración del fruto y, por otro, reguladores del clado *AGAMOUS* que se han diversificado en términos de funciones específicas reteniendo sus actividades en el proceso de dispersión de la semilla (figura 13).

Recientemente, Liu et al (2015) demostraron que la represión mediada por RNAi del gen *SIDML2* (*DEMETER-LIKE* demetilasa de ADN) inhibe la demetilación de ADN en tomate. Esta hipermetilación del ADN se traduce en la represión de la expresión de factores transcripcionales implicados en la maduración del fruto, especialmente *NOR* y *CNR*. Así, el silenciamiento de *SIDML2* conduce a la inhibición del proceso de maduración del fruto. Los resultados obtenidos por estos autores sugieren que *SIDML2* desempeña un

papel elemental en la hipometilación requerida para que ocurra el proceso de maduración.

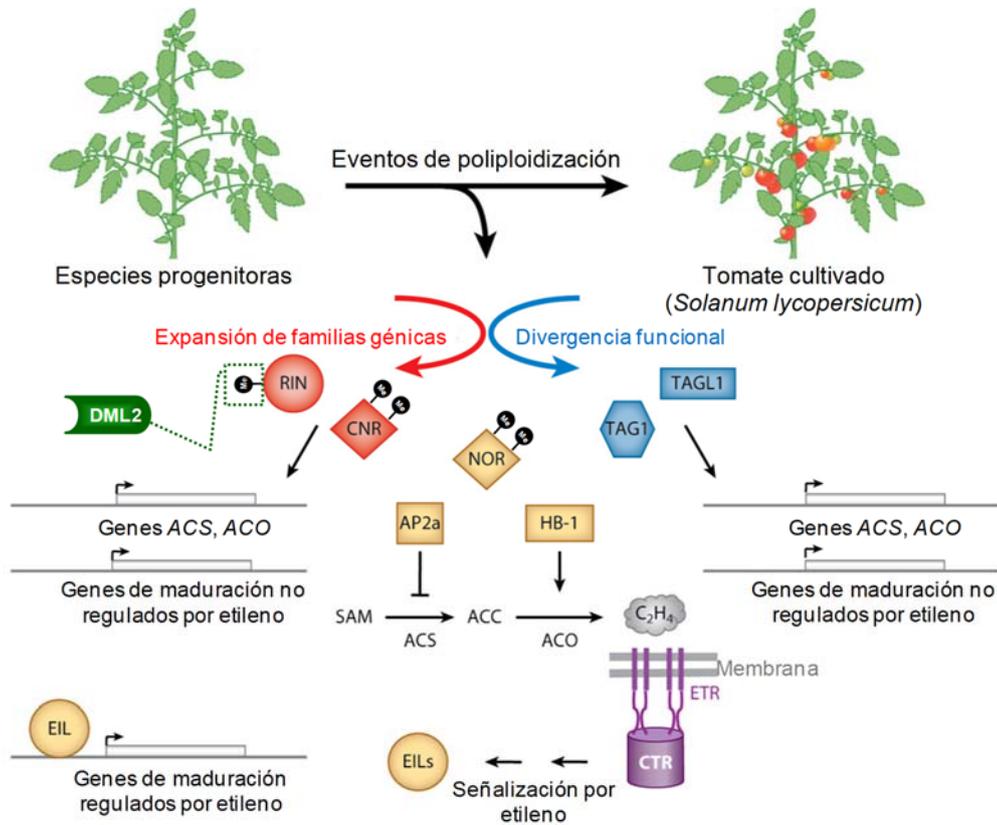


Figura 13. Factores de transcripción asociados al proceso de maduración que han evolucionado consecuencia de eventos de poliploidización para adquirir funciones diversas relacionadas con el desarrollo y maduración del fruto de tomate. En los clados SEPALLATA y CNR, la expansión de familias génicas habría dado como resultado actividades RIN y CNR relacionadas específicamente con el proceso de maduración. En el clado MADS-box AGAMOUS es más probable que se haya producido una divergencia funcional para promover la dispersión de la semilla en el contexto de un fruto carnoso. Los orígenes evolutivos de otros genes como *NOR*, *SIAP2a* o *LeHB-1* no serían tan obvios, aunque estos junto con *RIN*, *CNR* y *TAGL1* influyen en la expresión de genes relacionados con la síntesis de etileno, incluyendo miembros de la familia *ACS* y *ACO*. Los factores transcripcionales *RIN*, *NOR*, *CNR*, *TAGL1*, y posiblemente *TAG1*, son necesarios para que se expresen genes de maduración relacionados con las rutas dependientes e independientes de etileno. Además, *SIDML2* regula la hipometilación requerida para que ocurra el proceso de maduración. Este gen estaría relacionado con la demetilación de, al menos, los genes *NOR*, *CNR* y *RIN* (Adaptado de Klee y Giovannoni, 2011).

• representa metilación génica.

En definitiva, existen muchos factores de transcripción vinculados al proceso de maduración del fruto de tomate que podrían actuar conjuntamente y de forma coordinada, o de manera separada por encima de la cascada de señalización y síntesis de etileno. Teniendo en cuenta que quedan aún reguladores transcripcionales por identificar, la complejidad de este entramado regulatorio está aún por descubrir.

2. Antecedentes y Objetivos

El cuajado de un fruto es la etapa en la que se activa la transición de ovario a fruto en desarrollo con capacidad para convertirse en un órgano maduro que alberga y protege la semilla. Este proceso, regulado en gran medida por señales hormonales, tiene lugar cuando la flor alcanza el estadio de antesis y está estrechamente vinculado a la polinización y fecundación. Aunque los ovarios de los cultivares habituales de tomate no son capaces de iniciar la transición a fruto en ausencia de polinización y fecundación, algunas mutaciones permiten el desarrollo de frutos sin que ocurran estos eventos a través de un proceso denominado partenocarpia. En muchos de estos mutantes, la partenocarpia es el resultado de un desequilibrio hormonal en los niveles de auxinas y giberelinas. Las investigaciones realizadas a lo largo de los últimos años han proporcionado un panorama coherente sobre el papel que desempeñan estas hormonas en el cuajado del fruto; sin embargo, nuestros conocimientos sobre la base genética de los diversos mecanismos implicados son aún escasos. El análisis de mutantes con alteraciones en la tasa de cuajado podría ser la estrategia ideal para identificar nuevos genes que intervienen en el proceso.

Conviene tener en cuenta, además, que el cuajado de fruto afecta en gran medida a la productividad y rentabilidad de un cultivo, especialmente en condiciones adversas. En tomate, la tasa de cuajado es uno de los componentes de la producción que más se ve afectado por el estrés salino; ya que, además de los efectos directos, la salinidad reduce la cantidad y viabilidad del polen, lo que se traduce en una disminución del cuajado dependiente de polinización. La evaluación de mutantes con cuajado de fruto independiente de polinización en condiciones limitantes para la producción de polen fértil tendría un enorme interés

tanto desde un punto de vista agronómico como de investigación básica. En este sentido, se podría caracterizar la interacción entre salinidad y desarrollo de frutos sin semilla, ya que en este caso el efecto del estrés sobre la producción de polen dejaría de tener importancia.

Con la finalidad de identificar genes que controlan caracteres del desarrollo de relevancia agronómica, así como determinantes de la tolerancia a la salinidad en tomate y especies silvestres relacionadas, en nuestro laboratorio se está abordando un programa de mutagénesis insercional en colaboración con los grupos del Dr. Lozano (Universidad de Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS-Murcia). Uno de los primeros mutantes insercionales identificados fue *Arlequín (Alq)*, cuyo carácter más relevante es la conversión homeótica de los sépalos en órganos análogos a un fruto (Pineda et al, 2010). En colaboración con el grupo del Dr. Lozano, se demostró que el gen etiquetado en el mutante es *TAGL1 (TOMATO AGAMOUS LIKE 1)* y que el fenotipo de *Alq* se debe a la expresión ectópica de *TAGL1 (ALQ/TAGL1)*. El análisis funcional de este gen reveló su participación en el control genético del desarrollo reproductivo de tomate y su papel esencial como regulador positivo de la maduración del fruto (Giménez et al, 2010). Más recientemente, se ha descubierto que es necesaria la actividad transcripcional de *ALQ/TAGL1* para el adecuado desarrollo de la cutícula del fruto de tomate (Giménez et al, 2015), y se ha investigado sobre la función divergente de los genes *TAG1* y *TAGL1/ALQ* así como el papel que desempeñan a lo largo del desarrollo del fruto (Giménez et al, 2016). En el mutante *Alq*, la transición a fruto de los sépalos se produce independientemente de eventos de polinización, y resultados previos parecen indicar que el cuajado de fruto verdadero también ocurre mayoritariamente a través de esta vía.

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado en el contexto de este programa de mutagénesis insercional y tiene como objetivo central avanzar en el conocimiento de los genes y mecanismos que determinan el cuajado del fruto de tomate. Para ello, hemos abordado la caracterización de dos mutantes de tomate con menor tasa de cuajado (*Lfs2084* y *Lfs2448*), y hemos evaluado el fenotipo de mayor tasa de cuajado del mutante *Alq*. Además, hemos caracterizado la utilidad agronómica de la interacción entre el cuajado de fruto de *Alq* y la salinidad.

Para ello, se han abordado los siguientes objetivos:

1. Caracterización de la mutación *Lfs2084*, que incluye:
 - 1.1. Evaluar el fenotipo de menor tasa de cuajado
 - 1.2. Analizar el modo de herencia de la mutación
 - 1.3. Determinar la co-segregación entre un inserto funcional y la mutación
 - 1.4. Analizar la viabilidad del polen y realizar estudios de histología
 - 1.5. Analizar el contenido endógeno de hormonas
 - 1.6. Analizar la expresión de genes implicados en el cuajado de fruto
2. Caracterización de la mutación *Lfs2448*, que incluye:
 - 2.1. Evaluar el fenotipo de menor tasa de cuajado
 - 2.2. Analizar el modo de herencia de la mutación
 - 2.3. Determinar la co-segregación entre un inserto funcional y la mutación
 - 2.4. Analizar la viabilidad del polen y realizar estudios de histología
 - 2.5. Determinar la localización molecular de la mutación
3. Caracterización de la mutación *Alq*, que incluye:
 - 3.1. Evaluar la tasa de crecimiento de *Alq*
 - 3.2. Evaluar el desarrollo radicular *in vitro*
 - 3.3. Evaluar la tasa de crecimiento de injertos entre *Alq* y el WT
 - 3.4. Evaluar *in vitro* el comportamiento del mutante *Alq* en condiciones de estrés osmótico
 - 3.5. Evaluar la tasa de cuajado de fruto del mutante *Alq* y de líneas con los genes *ALQ* y *TAG1* silenciados
 - 3.6. Analizar la viabilidad del polen y realizar estudios de histología
 - 3.7. Evaluar el cuajado prematuro de fruto en el mutante *Alq*
 - 3.8. Analizar la expresión de genes implicados en cuajado de fruto
 - 3.9. Evaluar la tasa de cuajado de fruto del mutante *Alq* en condiciones moderadas de salinidad

3. Material y Métodos

3.1. Material vegetal

Los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo con 3 mutantes de T-DNA: *Arlequín (Alq)*, *Lower fruit setting 2084 (Lfs2084)* y *Lfs2084*. La mutación *Alq* se detectó en una línea de tomate destinada al consumo en fresco, de crecimiento determinado y que desarrolla frutos con morfología redondo-alargada (Pineda et al, 2010). Los mutantes *Lfs2084* y *Lfs2084* se detectaron durante el escrutinio de líneas T-DNA de tomate MoneyMaker que se llevó a cabo a lo largo de la realización de este trabajo de investigación (datos no mostrados). El cultivar MoneyMaker, introducido por el inglés F. Stonor a mitad del pasado siglo, es muy popular debido a que produce frutos de un atractivo y brillante color rojo cadmio, y de una increíble uniformidad, tanto en su morfología como en el proceso de maduración. Como suele ocurrir en algunas variedades y cultivares comerciales después de numerosos ciclos de autofecundación, MoneyMaker posee un fondo genético muy conservado que le proporciona caracteres de fruto muy homogéneos y una heredabilidad asegurada.

3.2. Técnicas básicas de cultivo *in vitro*

3.2.1. Esterilización de las semillas

Las semillas se esterilizan superficialmente por inmersión, durante 30 minutos, en una solución de lejía comercial diluida al 50% (5% de hipoclorito de sodio) equivalente a 50 g de cloro activo por litro, a que se le añaden 2 gotas de detergente 7X-0-matic (*Flow Laboratories*) para romper la tensión superficial de los tejidos, lo que mejora el contacto entre el tejido y el esterilizante. A

continuación, se elimina la solución desinfectante mediante tres lavados sucesivos (5, 10 y 15 minutos, respectivamente) con agua destilada estéril.

3.2.2. Germinación y obtención de plántulas axénicas

Tras la desinfección, las semillas se transfieren a placas petri con dos capas de papel de filtro saturado de agua destilada estéril. Las placas, selladas con parafilm, se mantienen en oscuridad a 28°C hasta la germinación de las semillas. Después de la nascencia, es decir, en el momento en el que emerge la radícula, las semillas se transfieren a recipientes de vidrio (105 mm de altura x 95 mm de diámetro) que contienen 50 ml de medio de germinación (MG). Este medio está compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 10 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar bacteriológico europeo (Sumilab s.l). El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCL antes de añadir el agente gelificante. El medio de cultivo se esteriliza por calor húmedo en autoclave, a 115°C durante 30 minutos. El cultivo de las plántulas tiene lugar en una cámara de cultivo en condiciones de luz, temperatura y humedad controladas: fotoperiodo de 16 horas luz con una intensidad luminosa de 2000 luxes - equivalente a 34 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ - suministrada por una fuente de luz fría y una temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{C}$ y 70% de HR durante el periodo oscuro-40% durante el periodo luminoso y $22 \pm 2^\circ \text{C}$ / 70% de HR durante el periodo oscuro.

3.2.3. Cultivo de explantes primarios

A los 7 días del inicio de la germinación se procede a la extracción de los explantes de cotiledón. Una vez separados los dos cotiledones de la plántula se eliminan los extremos para incrementar la superficie de corte obteniéndose 2 explantes por genotipo individual. Una vez cortados, los explantes se cultivan con el envés en contacto con el medio de cultivo. Para el cultivo de explantes se emplean placas petri (90 mm de diámetro x 30 mm de altura) con 30 ml de medio de cultivo, selladas con parafilm. Las condiciones de incubación son las mismas que las descritas en el apartado 3.2.2.

3.2.4. Inducción de organogénesis

El medio de cultivo empleado para la inducción de organogénesis en los explantes de tomate es el IKZ 4.0/4.0/1.0. Esta combinación de reguladores (4.0 mg/l de ácido indolacético + 4.0 mg/l de quinetina + 1.0 mg/l zeatina) en el medio de cultivo da lugar a la formación de callos que presentan zonas compactas de color verde en las que se desarrollan yemas, yemas-ápice y brotes.

3.2.5. Enraizamiento de brotes y propagación clonal de las plantas

Para el enraizamiento y clonación de plantas, los brotes se cultivan en el medio de clonación IBA 1.0, compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa, 0.1 g/L inositol, 0.001 g/L de T-CLH y 1 mg/l de ácido indolbutírico (hormona que favorece la emisión de raíces). El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCL antes de añadir el agente gelificante y se esteriliza por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos. Las primeras raíces aparecen aproximadamente a los 7 días del cultivo. A los 30 días la planta axénica suele tener un sistema radicular bien desarrollado, y la parte aérea presenta una yema caulinar y varias yemas axilares. El tipo de recipiente que utilizamos (150 mm de altura x 60 mm de diámetro) favorece la elongación de entrenudos, lo que facilita la propagación clonal de la planta axénica. Las condiciones de incubación de las plantas axénicas son las descritas en el apartado 3.2.2.

3.2.6. Evaluación del desarrollo radicular *in vitro*

Las semillas, tras su esterilización y germinación (apartados 3.2.1 y 3.2.2), se siembran en tubos de vidrio (145 mm de altura x 22 mm de diámetro) o placas de metacrilato (24 cm de altura, 20 cm de anchura y 2 cm de profundidad) que contienen un medio compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa, 0.1 g/L inositol, 0.001 g/L de T-CLH. El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCL antes de añadir el agente gelificante y se esteriliza por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos. A los 25 días se evaluaron los siguientes parámetros radiculares: longitud de la raíz principal, nº de raíces laterales y longitud de algunas de las raíces laterales más próximas al hipocotilo. La evaluación de estos parámetros en el mutante *Alq* se realizó a los 7 días (se ha iniciado el desarrollo de las primeras raíces laterales) y a los 25 días (se ha producido la elongación de las raíces laterales y se ha iniciado el desarrollo de raíces terciarias). Las condiciones de incubación son las descritas en el apartado 3.2.2.

3.2.7. Evaluación *in vitro* de la tolerancia a estrés hídrico

El ensayo comparativo del desarrollo de plantas WT y *Alq* en condiciones estándar de crecimiento y en medio suplementado con manitol *in vitro* se llevó a cabo en tubos de vidrio (145 mm de altura x 22 mm de diámetro). El medio utilizado fue el descrito en el apartado 5.2.4., con la diferencia de que el medio de

cultivo de las plántulas sometidas a estrés hídrico se suplementó con un 100 mM de manitol. A los 30 días (medio sin manitol) y 60 días (medio con manitol) se evaluaron los siguientes parámetros: longitud del tallo, longitud de las raíces y número de hojas.

3.2.8. Análisis de la resistencia-sensibilidad a la kanamicina

El análisis de la resistencia o sensibilidad a la kanamicina de las plantas se puede realizar de dos maneras: 1) A partir de yemas axilares. Una vez que la planta axénica se ha desarrollado en el medio de clonación (apartado 3.2.4), el brote principal se vuelve a transferir a medio de clonación (para mantener el genotipo) y una o varias yemas axilares se transfieren a medio de clonación suplementado con 100 mg/L de kanamicina. 2) A partir de explantes de cotiledón. En este caso, a los 7 días de la germinación de la semilla (apartados 3.2.1 y 3.2.2), los explantes de cotiledón se transfieren a medio organogénico (apartado 3.2.4) suplementado con 100 mg/L de kanamicina y los brotes a medio de clonación (apartado 3.2.4).

3.3. Aclimatación y trasplante

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

estadio de desarrollo de la planta, incrementándose el número y la extensión de los mismos en función de los requerimientos hídricos de la planta).

3.4. Obtención de progenies a partir de plantas mutantes

La obtención de retrocruces es una práctica habitual en un mutante dominante. La polinización cruzada entre las plantas se realiza aplicando polen de la flor donadora (obtenido en el estadio de desarrollo en el que las anteras están dehiscentes, es decir, en estadio de antesis) sobre el estigma de la flor receptora (en un estadio de desarrollo anterior a la dehiscencia de la antera, es decir, en estadio de pre-antesis). Para ello, se recolectan flores en antesis del parental donador y mediante la aplicación de golpes repetidos sobre una placa pequeña de petri ($\varnothing = 45$ mm, placas Corning), el polen se deposita en el interior de la placa. Posteriormente, se emascula la flor receptora para polinizar con el polen recolectado. La obtener progenies de autofecundación no se requiere de ninguna acción ya que las plantas de tomate son autogamas (i.e. realizan autopolinización).

3.5. Análisis genético de líneas T-DNA y determinación de co-segregación

La caracterización genética se ha llevado a cabo con progenies procedentes de autofecundación o retrocruce (apartado 3.2.8). Se contabilizó el número de plantas con un fenotipo diferencial (i.e. resistencia y sensibilidad a la kanamicina, o fenotipo WT y fenotipo mutante), y las segregaciones se analizaron mediante el test χ^2 , cuya fórmula es la siguiente: $\chi^2 = \sum [(O_i - E_i)^2 \div E_i]$, donde O_i hace referencia a cada valor observado y E_i a cada valor esperado.

Para demostrar cosegregación entre un inserto con *nptII* funcional (resistencia a la kanamicina) y la mutación hay que comprobar, en un número suficiente de plantas, que ninguna de las plantas con fenotipo mutante es sensible a la kanamicina. Para mutaciones dominantes, lo más eficaz es analizar la progenie de retrocruce entre el WT y una planta mutante portadora de una sola copia de *nptII*. En este caso, basta con comprobar que 5 plantas mutantes son resistentes a la kanamicina para demostrar la existencia de co-segregación con una probabilidad de fallo del 3,13%.

3.6. Caracterización de líneas T-DNA

Para la identificación de mutaciones dominantes, semidominantes o aditivas, tras la aclimatación y trasplante de los transformantes primarios, las plantas se

cultivan en invernaderos de cristal tipo capilla (apartado 3.2.7). La caracterización fenotípica se ha llevado a cabo evaluando caracteres básicos relacionados con el desarrollo vegetativo (i.e.: morfología, aspecto, color y tamaño de las hojas, grosor del tallo, número de fitómeros hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias, distancia hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias en las siete primeras inflorescencias, o altura de la planta a lo largo del tiempo) y con el desarrollo reproductivo (i.e.: tamaño y color de la flor y de los diferentes verticilos florales, alteraciones en algún verticilo, número de flores por inflorescencia, número de frutos por inflorescencia, tamaño y color del fruto, y número de semillas por fruto).

3.6.1. Caracterización del desarrollo reproductivo

3.6.1.a. Caracterización de flores: estadios del desarrollo floral

En diferentes experimentos se han seleccionado estadios en los que se pudieran analizar cambios relevantes en la génesis de los verticilos reproductivos (i.e. tercer y cuarto verticilo). Los experimentos realizados en la Tesis doctoral contemplan todos o algunos de los siguientes estadios del desarrollo floral: botón floral (BF1 = flores de 5 mm; BF2 = flores de 7 mm y BF2 = flores de 9 mm), pre-antesis, antesis y post-antesis (5 días posteriores a la antesis). En los estadios de BF la flor se encuentra aún cerrada y el polen se encuentra en etapa de tétrada (BF1), microspora vacuolada (BF2) y polen medio (BF3). Por lo que respecta a los óvulos, entre el estadio de BF1 y BF2 se ha iniciado el desarrollo del tegumento de los óvulos, y algunos óvulos han iniciado la meiosis; mientras que en el estadio BF3 la mayoría de los óvulos han iniciado la meiosis y en algunos se empieza a diferenciar el saco embrionario. En el estadio de pre-antesis los sépalos y los pétalos ya se han abierto y exhiben un ángulo de apertura de unos 45°. En este estadio, el cono estaminal es aun de color verde. Los granos de polen inician la diferenciación de los núcleos vegetativo y generativo, y empiezan a acumular cuerpos lipídicos. Los óvulos, de tipo anátropo, se encuentran completamente diferenciados. En el estadio de antesis los sépalos y los pétalos se han abierto completamente y exhiben un ángulo de apertura de 180°. En este estadio, el cono estaminal es de color amarillo, se produce la dehiscencia de las anteras (apertura de los sacos polínicos) y liberación del polen. En el estadio de post-antesis (+5

días), los pétalos y el cono estaminal comienzan a senescer y los tejidos del ovario se encuentran en fase de intensas divisiones celulares.

3.6.1.b. Evaluación del tamaño del ovario

En el mutante *Alq* se evaluó el calibre de los ovarios de flores en los siguientes estadios del desarrollo floral: 5 y 2 días previos a la antesis floral, y en estadio de antesis. Para ello, se recolectaron 15 flores de cada línea (WT y *Alq*) en cada uno de los estadios florales descritos anteriormente, se eliminaron los tres verticilos externos, dejando al descubierto los ovarios que se fotografiaron en una lupa (Leica MZFLIII). El diámetro de los ovarios se midió con el programa informático ImageJ.

3.6.1.c. Análisis de la viabilidad de los granos de polen

Para analizar la viabilidad de los granos de polen se utilizaron varios métodos: i) el método de fijación y tinción de los cromosomas con una solución de acetato de carmín o con 2,3,5-triphenil tetrazolium chloride (TTC), ii) tinción con Diacetato de Fluoresceína (FDA), iii) tinción con DAPI (*4,6-diamino-2-phenylindole*) y iv) germinación *in vivo* de tubos polínicos.

i) El acetato de carmín y el tetrazoilo tiñen los granos de polen viable de color rojo o rojo intenso-violeta respectivamente. Para realizar el análisis, se colocan los granos de polen sobre un portaobjetos y se añade una gota de la solución (acetato de carmín o tetrazolio). Tras la tinción, las muestras se observan al microscopio óptico. La solución de acetato de carmín se prepara diluyendo 0,05 g de carmín en 10 mL de ácido acético glacial al 45%, calentando hasta la ebullición. Posteriormente, la preparación se filtra a través de una malla con poros de 15-20 μm para eliminar los residuos sólidos no diluidos. A continuación, se diluye en glicerol al 30% (proporción 1:1). La solución de Tetrazolio (TTC) se prepara diluyendo 0,1 gramos de la sal en agua destilada a un pH comprendido entre 6,5-7,5. Las soluciones deben guardarse a temperatura ambiente en oscuridad o en botellas de color ámbar para protegerlas de la luz. Esta prueba se realizó con polen de flores en estadio de antesis.

ii) El Diacetato de Fluoresceína (FDA) permite distinguir entre células vivas y muertas mediante fluorescencia (Microscopio Óptico Leica DM5000 B con lámpara de mercurio). Para analizar la viabilidad, se extrae el polen, se añaden 10

μ L de FDA y sobre la preparación se coloca un cubreobjetos para ser analizada en el microscopio. Esta prueba se realizó con polen de flores en estadio de antesis.

iii) El DAPI es un fluorocromo específico de tinción del ADN que permite observar los núcleos de las microsporas/polen. Para el análisis de la viabilidad de los granos de polen (en distintos estadios), se extraen las anteras y se cortan en finas secciones sobre un portaobjetos, se añaden 10 μ L de DAPI y sobre la preparación se coloca un cubreobjetos al que se le aplica una leve presión. Posteriormente se analiza la preparación al microscopio (Microscopio Óptico Leica DM5000 B con lámpara de mercurio). Esta prueba se realizó con polen de flores en estadios de BF (1, 2 y 3), pre-antesis y antesis.

iv) Para la prueba de viabilidad de polen mediante la germinación del tubo polínico en pistilos se realizan polinizaciones manuales con el polen que se desea analizar sobre el estigma de flores en estadio de pre-antesis. Transcurrido un determinado número de horas (8, 24, 48 horas), se recolectan los pistilos y se fijan en FAE (10% de formaldehído al 37%, 5% de ácido acético glacial, 50% de etanol absoluto y 35% de agua destilada). Para eliminar el fijador se lava con agua durante un periodo de 3-6 horas, se trata con NaOH 1N durante un periodo de 6 horas (para reblandecer el tejido), y de nuevo se lava con agua. Posteriormente se añade una gota de azul de anilina (al 0,1% w/v en K_3PO_4 0,1N) sobre el cada pistilo y se coloca un portaobjetos. Tras 20 minutos de incubación en condiciones de oscuridad se puede visualizar el desarrollo de los tubos polínicos que emiten fluorescencia en un microscopio con lámpara de mercurio (Leica DM5000 B).

3.6.1.d. Análisis histológicos

Para realizar la inclusión en parafina, las muestras se fijan en FAE inmediatamente después de su recolección. Posteriormente, se someten a dos pulsos de vacío, de 5 min cada uno, se les cambia la solución de fijación y se mantienen en esta solución entre 4 y 16 h a 4°C. Tras la fijación, los tejidos se deshidratan mediante lavados de 30 min en etanol a concentraciones crecientes (15%, 30%, 50%, 70%). A partir de esta etapa las muestras se pueden conservar a 4°C en etanol al 70% indefinidamente. La inclusión en parafina se realiza mediante series de etanol 100%:Histo-Clear, Histo-Clear e Histo-Clear:parafina (Histo-Clear, histological clearing agent, National Diagnostic) durante 4 horas en

cada paso, hasta llegar a parafina pura (Paraplast embedding media, Sigma), donde se mantienen a 58°C durante 2 días, realizando 3 cambios de parafina cada día. En este momento, la parafina con las muestras se vierte en moldes adecuados que se almacenan a 4°C hasta la realización de los cortes.

Para realizar los cortes, las muestras incluidas en parafina se seccionan en un microtomo rotatorio Microm a un espesor de 0,8 µm. Los cortes que se obtienen se colocan en un baño de agua a 37°C y se montan sobre portaobjetos de adhesión, Polysine® (Thermo scientific). Posteriormente se secan sobre una placa térmica a 40°C durante 24 h.

A la sección de tejido incluido en parafina sobre el portaobjetos de adhesión se le elimina la parafina en Histo-Clear durante 10 min, luego se rehidrata en soluciones decrecientes de etanol/agua (100% - 10 min, 90% - 5 min, 70% - 5 min, 50% - 5 min), y finalmente en agua destilada durante 10 min. La tinción de las secciones sin parafina se realiza con azul de toluidina 0,01% en agua, durante 4 min. Después se realiza un lavado con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Las observaciones y registro fotográfico de los cortes histológicos que se presentan en esta Tesis se han realizado en el Microscopio Óptico Leica DM5000 equipado con una cámara fotográfica Nikon.

En los cortes histológicos realizados en los ovarios del mutante *Alq* se estimó el tamaño de las células pericárpicas y el grosor del pericarpo de ovarios en estadio de antesis floral. Respecto al tamaño de las células, en secciones transversales se midió el diámetro mayor de 25 células/ovario en un total de 6 ovarios (150 células). El espesor del pericarpo se determinó en 6 ovarios de cada línea (WT y *Alq*) y en cada ovario se midieron 4 regiones sobre la base de un sistema de referencia cartesiano. Además, se determinó el número de capas celulares en el pericarpo, contabilizando el número de células a través del pericarpo a lo largo de una línea perpendicular a la epidermis y el endocarpo (evitando las zonas en las que se encuentran los haces vasculares).

3.7. Injertos

Para realizar injertos, previamente se siembran semillas pre-germinadas en macetas de plástico (polietileno negro Ø: 9 cm, Os-plastic) que contiene fibra de coco estéril (fibra de ¾ de Cocoterra). A los 7-15 días de la emergencia, se seleccionan las plántulas con un grosor de hipocotilo similar, y se eliminan los cotiledones y las hojas desarrolladas dejando solo el ápice meristemático.

Posteriormente se realiza un corte bisel con la ayuda de un bisturí. Para la sujeción del injerto se emplea una pinza de silicona.

3.8. Emasculación de flores

Para la evaluación del cuajado de fruto en ausencia de polinización se seleccionan flores en estadios previos a la antesis floral y se les elimina el tercer verticilo de las anteras para evitar polinización accidental. Para evaluar el cuajado prematuro del mutante *Alq* se emascularon en torno a 70 flores de cada línea (WT y *Alq*).

3.9. Evaluación de la producción

Se utilizaron 6 plantas de cada genotipo (WT o *Alq*) en cada uno de los dos experimentos o condiciones (sin o con sal). Las semillas, previamente pregerminadas (apartados 3.2.1 y 3.2.2), se transfirieron directamente a macetas (\emptyset : 28 cm, capacidad 12 L, Maceflor) con fibra de coco. El cultivo de las plantas se realizó en invernadero tipo capilla con las condiciones de cultivo que se describen en el apartado 3.2.7. La fertirrigación se realizó tal y como se describe en el apartado 3.2.7, con la diferencia de que la solución de fertirrigación de las plantas sometidas a estrés salino se suplementó con un 50 mM de NaCl. El tratamiento salino se inició cuando las plantas habían desarrollado 4 hojas verdaderas y se mantuvo a lo largo de todo el cultivo. Se evaluaron los siguientes parámetros: flores y frutos por inflorescencia (en las primeras 7 inflorescencias), y peso de los frutos recolectados. A partir de las flores y frutos por inflorescencia se pudo determinar la tasa de cuajado $[(n^{\circ} \text{ frutos} / n^{\circ} \text{ flores}) \times 100]$ de cada una de las 7 inflorescencias de cada planta. El promedio de las tasas de cuajado de las 7 inflorescencias permitió determinar la tasa de cuajado por planta, y el promedio de la tasa de cuajado de las 6 plantas permitió determinar la tasa de cuajado por línea. La suma de los pesos de los frutos de cada planta permitió determinar la producción por planta, y el promedio de la producción de las 6 plantas permitió determinar la producción por línea.

3.10. Cuantificación endógena de hormonas

La extracción y cuantificación de hormona la llevó a cabo el Servicio de Cuantificación de Hormonas del IBMCP (instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, centro mixto UPV-CSIC). Para ello, se tomaron muestras de entre 100

y 200 mg de tejido fresco (3 réplicas biológicas por cada genotipo) y se molieron con ayuda de nitrógeno líquido. El protocolo utilizado en este análisis incluye, la extracción y purificación de las muestras con 2-3 columnas de extracción en fase sólida (SPE; de fase reversa e intercambio iónico), el uso de estándares internos deuterados (excepto para el caso de JA, que se utilizará dihidrojasmonico), y el análisis mediante UPLC-espectrometría de masas (UPLC acoplada a Q-Exactive, Orbitrap). Las hormonas que se cuantificaron fueron las siguientes: i) giberelinas (GAs): las dos GAs bioactivas de la ruta de biosíntesis (GA_1 y GA_4), ii) hormonas ácidas: ácido jasmonico (JA), ácido salicílico (SA), ácido indol-3-acético (IAA) y ácido abscísico (ABA), y las citoquininas dihidrozeatina (DHZ), isopenteniladenina (iP) y trans-zeatina (tZ).

3.11. Análisis de expresión de genes mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

El análisis de expresión génica se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en la Universidad de Almería bajo la supervisión del grupo del Dr. Lozano. Se utilizaron flores en los estadios de pre-antesis, antesis y cinco días posteriores a la antesis. Los oligonucleótidos se diseñan utilizando el programa Primer Express v.2.0 (Applied Biosystems™) a partir de las regiones específicas de cada gen (tabla 1).

La preparación del RNA total a partir de las muestras se lleva a cabo usando el reactivo Trizol (Invitrogen, acorde a las instrucciones del manual). La contaminación de ADN se eliminó usando el kit DNA-free™ (Ambion). El RNA total se usó para la síntesis de cDNA mediante una transcriptasa reversa ML-MLV (Invitrogene) y una mezcla al azar de cebadores hexamer y oligo (dT) (18-mer). Para el análisis de expresión por RT-PCR se utilizaron parejas específicas de cebadores de cada gen, el kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y el equipo de PCR Real Time PCR 7300 (Applied biosystems). La recopilación y análisis de los datos se abordó a través del sistema 7300 Sequence detection Software v1.2 (Applied Biosystems). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias por comparación con el control mediante el método de cálculo $\Delta\Delta Ct$. El gen *Ubiquitina3* se usó como control en todos los análisis de expresión de genes. La ausencia de contaminación de DNA genómico en los ensayos de RT-PCR se demostró usando un amplicón específico de tomate (una secuencia intrónica) como control.

Tabla 1. Cebadores usados para las PCR cuantitativa a tiempo real y tamaño esperado del amplicón (pb)

Abreviación (Gen)	Número accesión	Cebadores de las secuencias directa (F) e inversa (R)	Tamaño (pb)
<i>LeSPL</i>	Solyc07g063670.2	F-ACCCACCAACTCACAAAAT R-TCCTGAGGAATAGGGTGATGA	92
<i>SIGA20ox1</i>	Solyc03g006880.2	F-TGCATCTCATATGAAACGTGAG R-TGAAGTTGTTGTAATAAGGCACA	90
<i>SIGA20ox2</i>	Solyc06g035530.2	F-AAAAATGAATCGAACATTCCTAGA R-CGGAACATCAAGTTCACCAA	84
<i>SIGA20ox2</i>	Solyc11g072310.1	F-TCATTGATGAAAAACGAGTCAAA R-GGTCATTTGAAAGTACCCCACT	133
<i>SIGA3ox1</i>	Solyc06g066820.2	F-CATGCATGGACATCATCAA R-TCGAGGTCGATCACTGGAAT	80
<i>SIGA3ox2</i>	Solyc03g119910.2	F-AAATCCTCATTGGACGACGA R-CTGGAATGGACTCCGCATTA	55
<i>SIGA2ox1</i>	Solyc05g053340.2	F-TCACCCCATGCTAGAATTTGTTG R-TGGTGTGTAGTGACCAATTCTAAGG	51
<i>SIGA2ox2</i>	Solyc07g056670.2	F-GAAAAAATTGCAGCCTCATAATAATTT R-TCCTAACATGGTGGGACTTTGTC	70
<i>SIIAA9</i>	Solyc04g076850.2	F-CACAAAACGGGTGAAGAGC R-TGCTGAGCTATCCAAGACCA	88
<i>SIARF7</i>	Solyc07g042260.2	F-GTTTGAATTGAGGGACAGC R-AAGGATCGTCACCAACAAGC	101
<i>SIARF8</i>	Solyc03g031970.2	F-CCCGAGGATGTGCAGAACT R-GCGGTTTAGGGATCCAACCT	51
<i>TAG1</i>	Solyc02g071730.2	F-CTTGATGCCAGGGAGTTCAT R-ATCGAATTGCTGAGGTGGAG	61
<i>ALQ (TAGL1)</i>	Solyc07g055920	F-AAAAGAGGGAGATTGAGCTGC R-CTCTACCTCTGCTATCTTTGCG	64
<i>TAGL6</i>	Solyc01g093960.2	F-TAACCCACCTCCCCTATTC R-CTCTCCCTCTCCCCATTTTT	105
<i>CycA1</i>	Solyc11g005090.1	F-TACTCTACTGTTTTTCTCTGGCT R-TCAGTTGGGATGTTCTTCTCA	160
<i>CycD3</i>	Solyc02g092980.2	F-GAACATCAACTCCACCCCC R-GAAAACTCCACCAATCCCAT	53
<i>CDKA1</i>	Solyc08g066330.2	F-CATAGTTTTGCCTGGAGTGG R-AGCCTGCGTCATCAAGAAAT	85
<i>SIWUS</i>	Solyc02g083950.2	F-CCCATGTGAAGATGGTGATG R-CTTCCATGCAAATGATTCCA	110

3.12. Tratamiento estadístico de los datos

El tratamiento estadístico se llevó a cabo comparando los valores medios de cada parámetro mediante el test de Fisher (diferencia mínima significativa) con un nivel de probabilidad del 5%.

4. Resultados

4.1. Lower fruit setting 2084 (*Lfs2084*): comentarios previos

En el contexto de esta Tesis Doctoral se identificó un mutante de naturaleza dominante, al que denominamos Lower fruit setting 2084 (*Lfs2084*), en el que prácticamente no había cuajado de frutos. Ante la imposibilidad de obtener progenies de autofecundación y con el objetivo de llevar a cabo el análisis genético y fenotípico del mutante, realizamos retrocruces con el WT en las dos direcciones, es decir, empleando polen de plantas WT para polinizar pistilos de plantas mutantes (*Lfs2084* x WT) y polinizando los pistilos del WT con polen mutante (WT x *Lfs2084*). Sin embargo, sólo pudimos obtener unos pocos frutos a partir del cruce *Lfs2084* x WT. Mediante el análisis de viabilidad del polen con acetato de Carmín pudimos ver que la mayoría de los granos de polen de las plantas mutantes se encontraban dañados (figura 14), lo que explicaba que no hubiéramos podido obtener frutos a partir del cruce WT x *Lfs2084*. La caracterización del mutante *Lfs2084* se inició, pues, con la progenie procedente del cruce *Lfs2084* x WT.

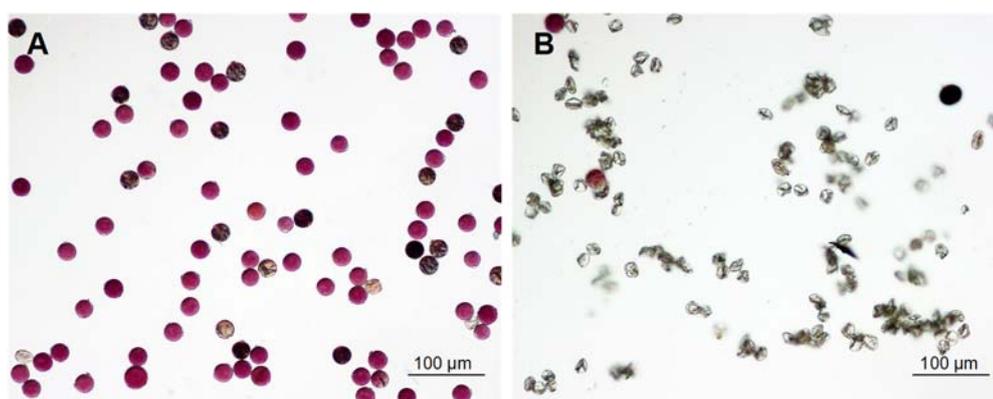


Figura 14. Ensayo *in vitro* de viabilidad del polen en el WT (A) y en el mutante *Lfs2084* (B).

4.1.1. Caracterización del mutante *Lfs2084*

Para llevar a cabo el análisis del modo de herencia y caracterizar el fenotipo de las plantas mutantes se cultivaron 35 plantas procedentes del retrocruce *Lfs2084* (♀) x WT (♂). Además, con el objetivo de determinar el número de insertos funcionales (i.e. insertos de T-DNA con un gen *nptII* funcional), antes de llevar las plantas mutantes al invernadero, se analizó la resistencia a la kanamicina de cada una de ellas. Acorde a lo cabe esperar en la progenie de retrocruce de un mutante dominante, los datos se ajustaron a una segregación fenotípica 1 WT : 1 *Lfs2084* (tabla 2).

Tabla 2. Análisis genético del mutante *Lfs2084*. A) Segregación fenotípica en la progenie de retrocruce. B) Resistencia o sensibilidad a la kanamicina (Km) de plantas de la progenie de retrocruce de fenotipo WT y mutante. C) Análisis χ^2 de la segregación fenotípica para una segregación esperada 1 WT : 1 M, y análisis χ^2 de la segregación para el carácter resistencia a la kanamicina. Se contemplan las segregaciones 3 Km^R:1 Km^S, 7 Km^R:1 Km^S y 15 Km^R:1 Km^S, bajo los supuestos de 2, 3 o 4 copias de T-DNA respectivamente.

	WT (♂)					<i>Lfs2084</i> (♀)
			(X)			
			↓			
A	WT		<i>Lfs2084</i>			
Observado fenotipo	15		20			
B	Km ^R	Km ^S	Km ^R	Km ^S		
Observado Km ^R : Km ^S	11	4	20	0		
C	WT : M = 15 : 20 → χ^2 (1:1) = 0,71 (< χ^2 1 g.l. (5%) = 3,84)					
	Kan ^R : Kan ^S = 31 : 4 → χ^2 (3:1) = 3,44 (< χ^2 1 g.l. (5%) = 3,84)					
	χ^2 (7:1) = 0,23 (< χ^2 1 g.l. (5%) = 3,84)					
	χ^2 (15:1) = 1,60 (< χ^2 1 g.l. (5%) = 3,84)					

Por otro lado, el análisis genético de resistencia a la kanamicina indicó que no había motivos para descartar la existencia de 2, 3 o 4 insertos con un gen *nptII* funcional en el mutante (tabla 2).

Por lo que respecta a la caracterización fenotípica de las plantas mutantes, evaluamos una serie de parámetros relacionados con el desarrollo vegetativo y reproductivo que nos permitieron detectar los caracteres más importantes que hacían distintivo al mutante respecto al WT. En relación con los caracteres del desarrollo vegetativo, no detectamos diferencias relevantes en el número de fitómeros entre inflorescencias y la distancia entre inflorescencias (figuras 15A y 15B). Tampoco detectamos diferencias en el tamaño de las hojas, aunque

podimos apreciar que las hojas de las plantas mutantes eran de un color verde más intenso y desarrollaban más tricomas que las del WT (figura 15C).

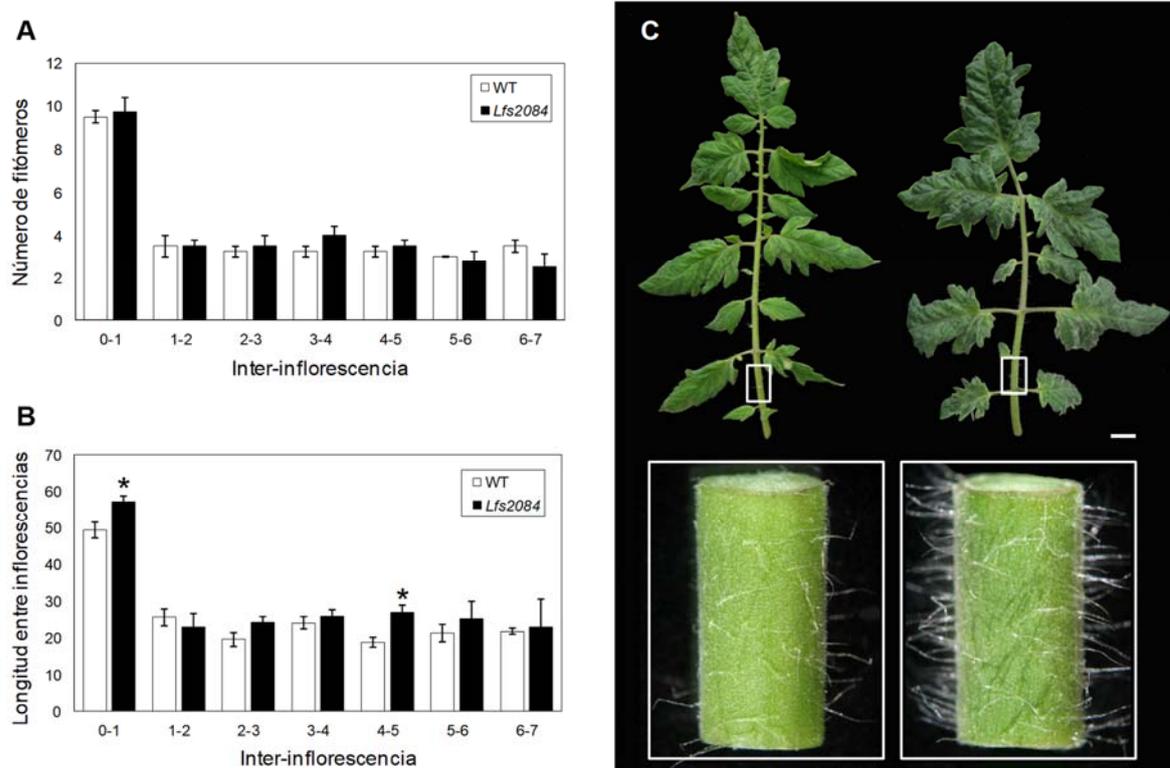


Figura 15. Evaluación de caracteres del desarrollo vegetativo en el WT y el mutante *Lfs2084*.

A) Número de fitómeros entre inflorescencias desde la base hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3,...). B) Distancia entre inflorescencias desde la base hasta la primera inflorescencia (0-1) y entre inflorescencias (1-2, 2-3,...). C) Hojas del WT (izda.) y del mutante (dcha), y detalle de la densidad de tricomas (parte inferior) en el peciolo de la hoja del WT (izda.) y del mutante (dcha.).

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Escala de barras: 1 cm

Respecto a los caracteres del desarrollo reproductivo, observamos que el mutante *Lfs2084* desarrollaba menos flores que el WT en la mayoría de las inflorescencias (figura 16A). Por planta, el número medio de flores por inflorescencia era ligeramente más bajo en el mutante, pero las diferencias no eran significativas a nivel estadístico (tabla 3). Lo más notable fue que la tasa de cuajado de las plantas mutantes era muy baja o nula en casi todas las inflorescencias (figura 16B). Por planta, la tasa de cuajado promedio resultó significativamente más baja en las plantas mutantes. En efecto, como se puede ver en la tabla 3, las plantas de fenotipo WT exhibieron una tasa de cuajado del 35%, mientras que la tasa de cuajado del mutante *Lfs2084* fue del 6%.

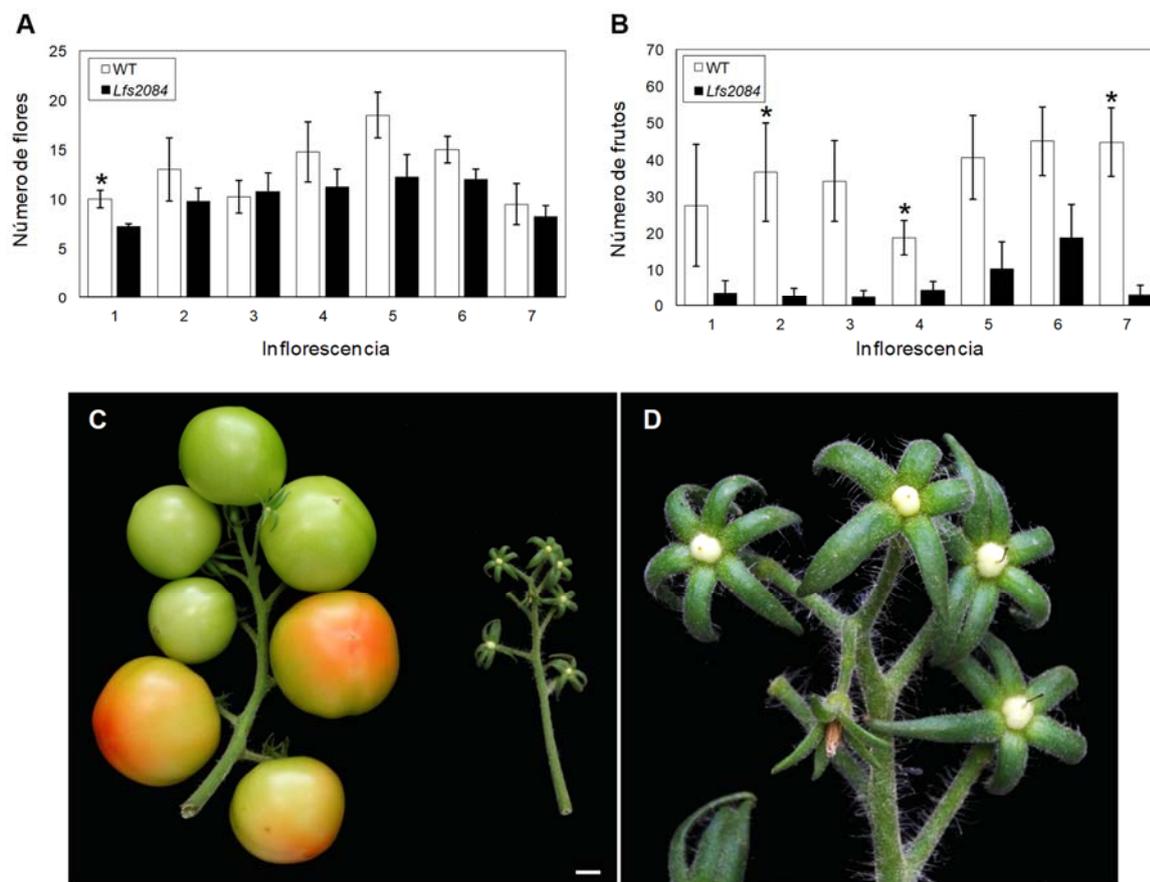


Figura 16. Evaluación de caracteres del desarrollo reproductivo en el WT y el mutante *Lfs2084*. A) Número de flores en las primeras 7 inflorescencias. B) Tasa de cuajado en las primeras 7 inflorescencias. C) Inflorescencia del WT (izda.) y del mutante (dcha). Se muestra una inflorescencia del WT en la que cuajan todos los frutos y una de las más frecuentes en el mutante, es decir, sin cuajado de fruto. D) Detalle de la ausencia de cuajado en la inflorescencia mutante. Nótese que donde no se produce cuajado tampoco se han desarrollado falsos frutos.

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Escala de barras: 1 cm

Tabla 3. Flores y frutos por inflorescencia, y tasa de cuajado en plantas WT y *Lfs2084*.

Los valores se expresan como la media \pm error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Parámetros	WT	<i>Lfs2084</i>
Flores por inflorescencia	13,00 \pm 1,25 (a)	10,21 \pm 0,72 (a)
Frutos por inflorescencia	4,61 \pm 0,71 (a)	0,71 \pm 0,29 (b)
Tasa de cuajado (%)	35,30 \pm 3,62 (a)	6,40 \pm 2,29 (b)

4.1.2. Identificación de un inserto responsable del fenotipo mutante

Como se puede ver en la tabla 2, el análisis de la progenie resultante del retrocruce entre *Lfs2084* y el WT indicó que todas las plantas de fenotipo mutante eran resistentes a la kanamicina, mientras que entre las WT algunas eran resistentes y otras eran sensibles. Sin embargo, el análisis de los datos indicó que no había motivos para descartar la existencia de 2, 3 o 4 insertos funcionales en el mutante (tabla 2). A partir de las plantas mutantes se obtuvo algún fruto de autofecundación (tabla 3) aunque las pocas semillas que contenían eran mayormente inviables. Teniendo en cuenta estos problemas, decidimos realizar cruzamientos manuales con el WT en las dos direcciones, es decir, utilizando el mutante como donador y como receptor de polen. El objetivo era identificar alguna progenie procedente de estas plantas de retrocruce que sólo segregara para un inserto funcional, lo que nos facilitaría el análisis de co-segregación entre el inserto y el fenotipo mutante. Se obtuvieron progenies de cruzamiento de la mayor parte de las plantas mutantes, pero los resultados más relevantes se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Resistencia o sensibilidad a la kanamicina (Km) en progenies de cruzamientos entre plantas mutantes (i.e. *Lfs2084-2*, 5 y 7) y el WT; y análisis χ^2 de las segregaciones 1 Km^R :1 Km^S, 3 Km^R :1 Km^S y 7 Km^R :1 Km^S, resultantes de la inserciones de 1, 2 y 3 insertos respectivamente.

Notas: 1) Las plantas mutantes (i.e. *Lfs2084-2*, 5 y 7) son las que se obtuvieron en el retrocruce entre el mutante dominante y el WT (tabla 2).

2) χ^2 t 1 g.l. (5%) = 3,84

Cruzamiento		Resistencia a kanamicina		1 inserto	2 insertos	3 insertos
♀	♂	Km ^R	Km ^S	χ^2 (1R : 1S)	χ^2 (3R : 1S)	χ^2 (7R : 1S)
<i>Lfs2084-2</i>	WT	13	5	3,56	0,07	2,68
WT	<i>Lfs2084-5</i>	0	22	-	-	-
<i>Lfs2084-7</i>	WT	5	9	1,14	11,52*	28,58*
WT	<i>Lfs2084-7</i>	0	26	-	-	-

La mayor parte de las líneas que se analizaron exhibían patrones de segregación similares a los resultantes del cruzamiento entre la planta mutante *Lfs2084-2* y el WT (tabla 4). En esta progenie, el análisis de segregación en medio con kanamicina indicaba que *Lfs2084-2* podía contener 1, 2 o 3 insertos funcionales. Los resultados más interesantes resultaron de los cruzamientos entre las plantas mutantes *Lfs2084-5* y *Lfs2084-7*, y el WT. En el caso de *Lfs2084-5*, sólo se obtuvo semilla utilizando polen del mutante. En realidad, en el momento

en el que se realizó ese cruce, casi al final de la cosecha, ya no quedaban muchas flores del mutante receptivas para ser polinizadas por el WT, pero tenía algunas flores en estadio de antesis. Los resultados de cruce resultaron realmente sorprendentes ya que todas las plantas de la progenie de ese cruce resultaron ser sensibles a la kanamicina (tabla 4). Conviene tener en cuenta que el mutante *Lfs2084-5* era resistente a la kanamicina (tabla 2). La progenie del cruce entre la planta *Lfs2084-7* (♀) y el WT (♂) se ajustaba a una segregación 1 : 1, acorde con la presencia de un inserto funcional en la planta *Lfs2084-7*, y los resultados descartaban la posibilidad de que esa planta tuviera más de un inserto funcional (tabla 4). Esta línea era la más adecuada para determinar la existencia de co-segregación entre el inserto y la mutación. Para nuestra sorpresa, lo que observamos fue que la progenie resultante del cruce en la dirección inversa (i.e. *Lfs2084-7* como donador de polen y WT como receptor) era, al igual que ocurría en la progenie del cruce *Lfs2084-5* x WT, completamente sensible a la kanamicina (tabla 4). Este resultado nos dio la pista para entender lo que ocurría. Los resultados sugerían que el único T-DNA presente en la planta *Lfs2084-7* promovía letalidad del gameto masculino (ver figuras 17 y 18).

Para ilustrarlo de una forma gráfica, representaremos el único inserto de T-DNA con la letra A, y el alelo nulo del WT correspondiente al mismo locus con esa letra minúscula (a). Por tanto, una planta transgénica con un único inserto de T-DNA tendrá el 50% de sus granos de polen con T-DNA (A) y el otro 50% sin T-DNA (a); y lo mismo ocurrirá en los óvulos (figura 17).

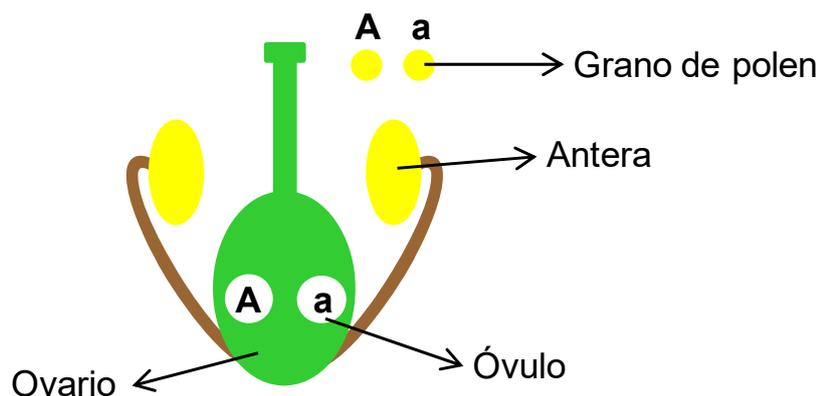


Figura 17. Ilustración simple de un ovario en el que los círculos blancos serían los óvulos y los amarillos los granos de polen. Si "A" representa el único T-DNA de esa planta y "a" el alelo nulo del WT, el 50% de los granos de polen contendrán el T-DNA y lo mismo ocurrirá en los óvulos.

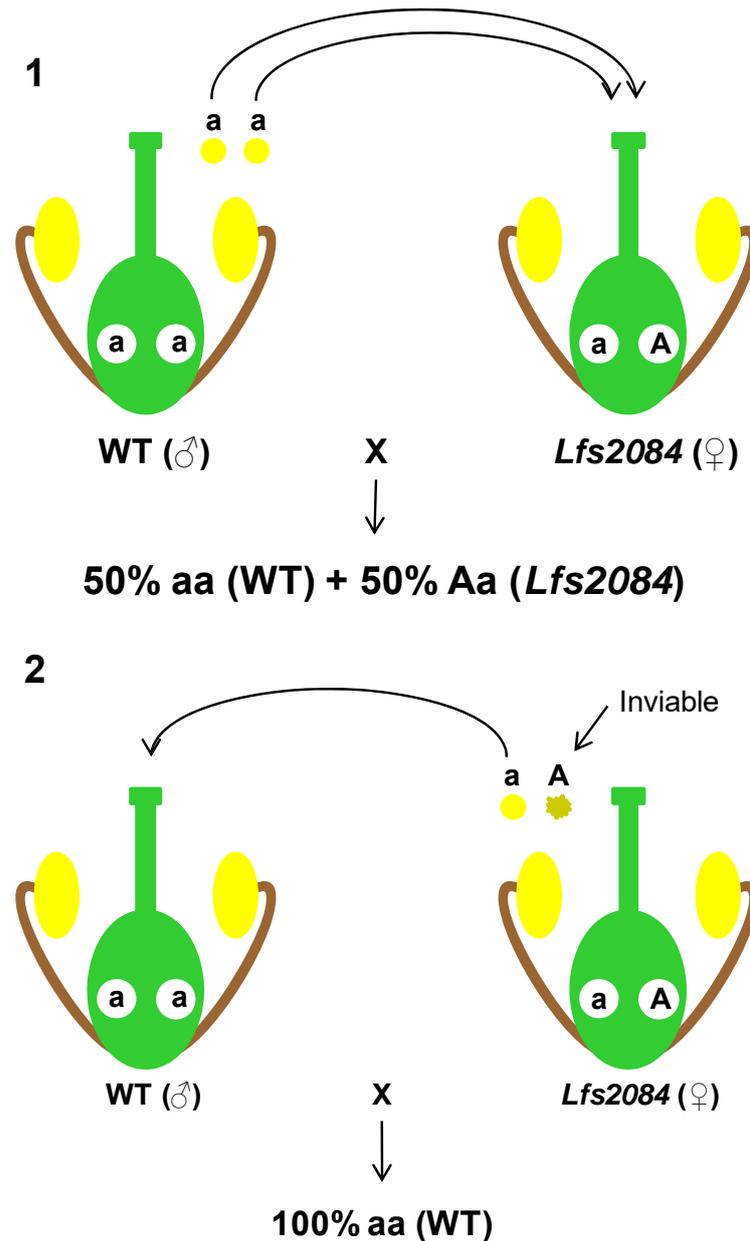


Figura 18. Cruzamientos entre una planta mutante (i.e. *Lfs2084-7*) con 1 inserto funcional (A) y el WT. 1) Cruce entre el WT como donante de polen (♂) y el mutante como receptor (♀). El 50% de la progenie contiene el inserto funcional que promueve la mutación dominante. 2). Cruce entre el WT como receptor de polen (♀) y el mutante como donador (♂). El polen del mutante con el inserto funcional es inviable, por lo que ninguna planta de la progenie contiene T-DNA y, por tanto, es sensible a la kanamicina.

Los datos de segregación obtenidos hasta el momento (tabla 2 y tabla 4) sugerían que el mutante podía ser insercional. Para verificarlo, se transfirieron a invernadero todas las plantas procedentes de los dos cruces entre el WT y el mutante *Lfs2084-7* (tabla 4). Pudimos comprobar que todas las plantas resistentes a la kanamicina del cruce *Lfs2084-7* (♀) x WT (♂) exhibían el fenotipo mutante (tabla 5). Estas plantas tenían hojas de color verde más intenso y con

más tricomas que las del WT; además, el cuajado era muy bajo o nulo en casi todas las inflorescencias (figura 19B). Por otro lado, todas las plantas sensibles a la kanamicina de los cruces *Lfs2084-7* (♀) x WT (♂), y WT (♀) x *Lfs2084-7* (♂) eran de fenotipo WT (figura 19A). Además, vimos que el color de los pétalos de las flores mutantes era más pálido (figura 19C vs 19D).

Tabla 5. Caracterización del fenotipo de las plantas procedentes de los cruzamientos entre el WT y el mutante *Lfs2084-7*, previamente evaluadas para la resistencia a la kanamicina (tabla 4).

<i>Lfs2084-7</i> (♀) x WT (♂)	Km ^R	Km ^S
Observado Km ^R : Km ^S	5	9
Observado fenotipo	M (<i>Lfs2084</i>)	WT
WT (♀) x <i>Lfs2084-7</i> (♂)	Km ^R	Km ^S
Observado Km ^R : Km ^S	0	26
Observado fenotipo	M (<i>Lfs2084</i>)	WT

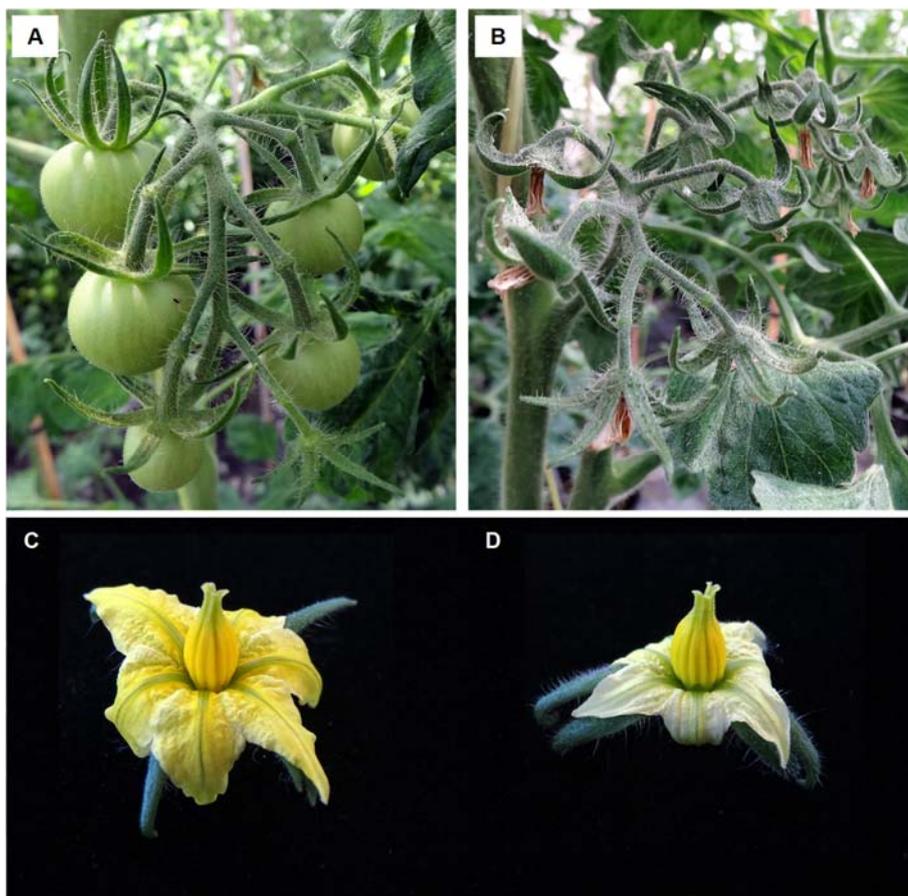


Figura 19. Inflorescencias y flores de plantas WT-Km^S (A y C) y *Lfs2084-7*-Km^R (B y D). En los sépalos de la flor mutante se aprecia con claridad la mayor densidad de tricomas.

En definitiva, los resultados indicaron que el único inserto de *Lfs2084-7* co-segrega con el fenotipo mutante y promueve tanto letalidad del gameto masculino (figura 18) como menor tasa de cuajado de fruto (figura 19B).

4.1.3. Pruebas de viabilidad del polen *in vitro* y análisis de histología en flores

Para ver si éramos capaces de visualizar algún tipo de alteración en los granos de polen del mutante, realizamos un análisis de viabilidad de polen *in vitro* con tetrazolio en flores de plantas WT y del mutante *Lfs2084-7*.

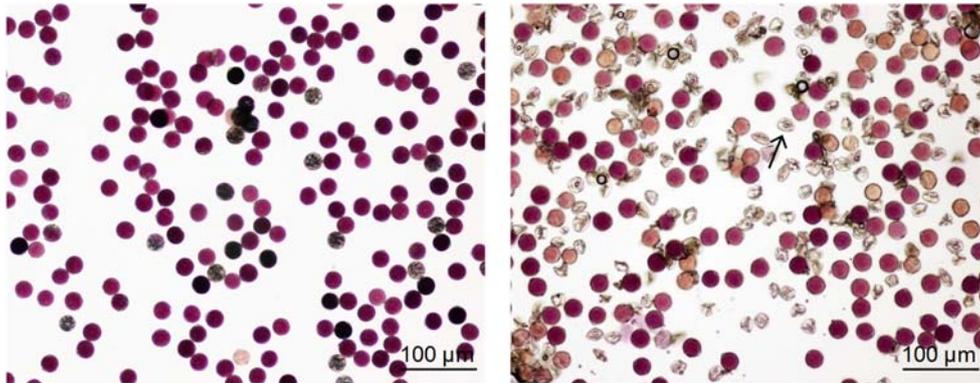


Figura 20. Ensayo *in vitro* de viabilidad del polen en el WT (izda) y *Lfs2084-7* (dcha). En torno al 50% del polen del mutante es inviable (la flecha señala uno de los granos de polen dañados).

Los resultados del análisis indicaron que en torno a la mitad de los granos de polen del mutante *Lfs2084-7* era aberrante y no se teñía, mientras que estas alteraciones no se observaron en los granos de polen del WT (figura 20). Los resultados de la prueba de viabilidad de polen parecían confirmar, pues, las conclusiones derivadas de los análisis de segregación en los dos cruces del mutante *Lfs2084-7* con el WT.

Con el objetivo de determinar en qué momento de la androgénesis se producía la degeneración de los granos de polen en el mutante, realizamos cortes histológicos en diferentes estadios del desarrollo floral. No detectamos alteraciones en los tejidos que componen la antera ni tampoco diferencias de tamaño. Tampoco parecía que el número de granos de polen producidos en las anteras de WT y del mutante fuese distinto. Sobre la base de las evidencias fotográficas, la principal diferencia radicaba en la degeneración de los granos de polen que se podía visualizar claramente a partir del estadio de pre-antesis (figura 21). En este estadio del desarrollo floral, los granos de polen del WT, que se encuentran en la etapa de polen bicelular temprano, eran de morfología esférica y

exhibían una tinción azul opaca, mientras que un alto porcentaje (~ 50%) de los del mutante eran de morfología irregular y diáfanos en lo que a la tinción se refiere. En estadio de antesis se observaron las mismas diferencias entre el WT y el mutante. En efecto, aproximadamente la mitad de los granos de polen maduro del mutante tenía la misma morfología y tinción que los del WT mientras que la otra mitad exhibía claras anomalías (figura 21). En definitiva, los granos de polen no parecían exhibir alteraciones durante la microsporogénesis, pero degeneraban durante la etapa de microgametogénesis.

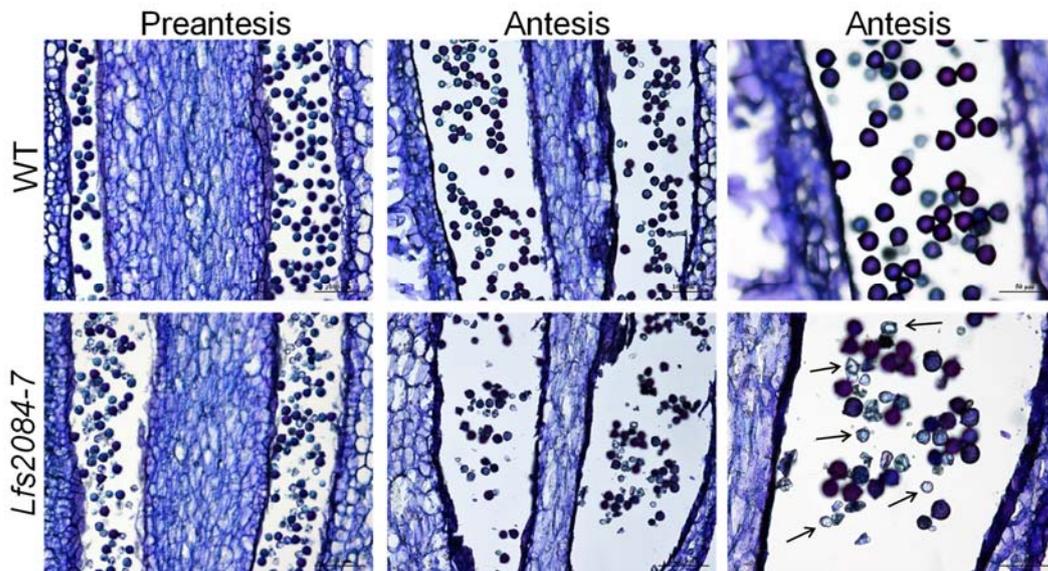


Figura 21. Secciones longitudinales de sacos polínicos del WT y del mutante *Lfs2084-7* en estadios florales de pre-antesis y antesis (las flechas señalan algunos de los granos de polen que han degenerado).

También se realizó un análisis histológico de los ovarios. No se observaron diferencias entre el WT y el mutante ni en el tamaño ni en la morfología de los óvulos (figura 22).

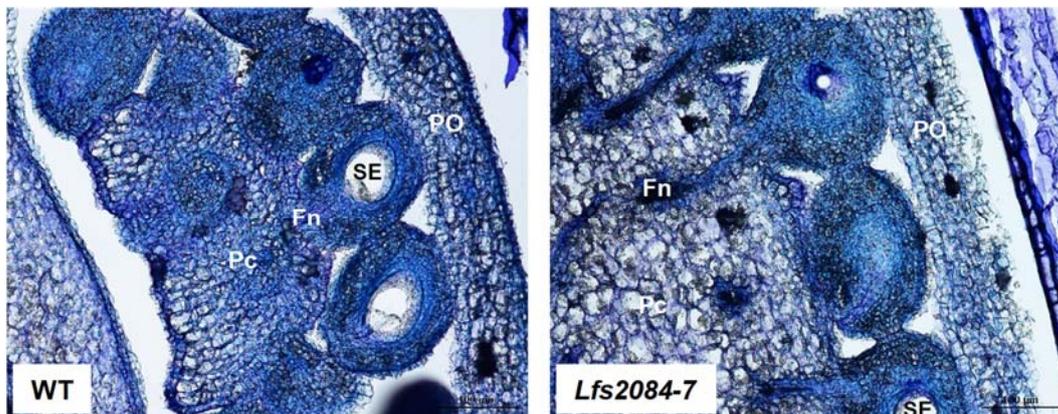


Figura 22. Detalle de los óvulos del WT y del mutante *Lfs2084-7* en estadio de antesis. SE = Saco embrionario, Fn = Funículo, Pc = Placenta, PO = Pericarpo del ovario

Tampoco apreciamos diferencias de tamaño o morfología entre los ovarios de plantas WT y mutantes en los estadios de pre-antesis y antesis (Figura 23). Sin embargo, en el estadio de post-antesis (5 días después de antesis) podíamos apreciar un incremento de tamaño de los ovarios del WT que no se producía en los ovarios del mutante, reflejando el inicio del desarrollo del fruto en el WT y la ausencia de cuajado en el mutante (figura 23).

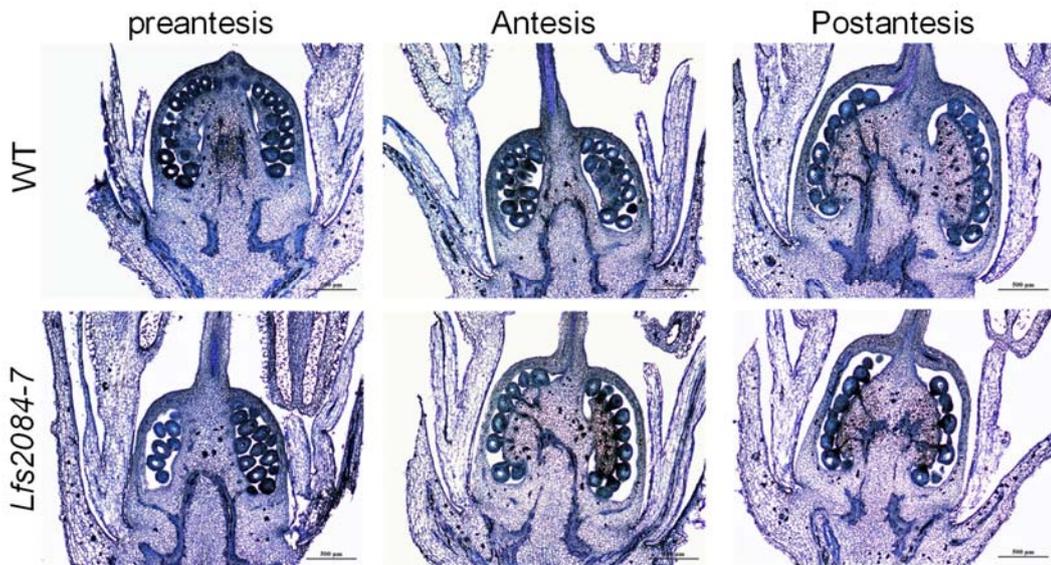


Figura 23. Detalle de los ovarios del WT y del mutante *Lfs2084-7* en los estadios de pre-antesis, antesis y 5 días post-antesis.

En definitiva, el análisis histológico nos permitió detectar que, a partir del estadio de pre-antesis, aproximadamente la mitad de los granos de polen del mutante eran inviables.

4.1.4. Análisis de viabilidad del polen *in vivo*

El análisis de viabilidad de polen *in vitro* con tetrazolio indicó que en torno a la mitad de los granos de polen del mutante *Lfs2084-7* era de morfología irregular y no se teñía. La histología en flores confirmó estos resultados, es decir, en torno a la mitad de los granos de polen del mutante parecía inviable. Las evidencias fotográficas indicaban que estas alteraciones se producían a partir de la etapa de pre-antesis.

Nos resultó sorprendente que la tasa de cuajado de fruto del mutante fuera prácticamente nula con un 50% de polen viable. Para comprobar si los granos de polen germinaban y se desarrollaban normalmente, decidimos hacer un análisis de la viabilidad del polen *in vivo*. Se practicaron polinizaciones manuales con

polen WT sobre flores WT; y con polen del mutante *Lfs2084-7* sobre flores del mutante.

Vimos que el polen WT germinaba y desarrollaba tubos polínicos normales en los ovarios WT (figura 24).

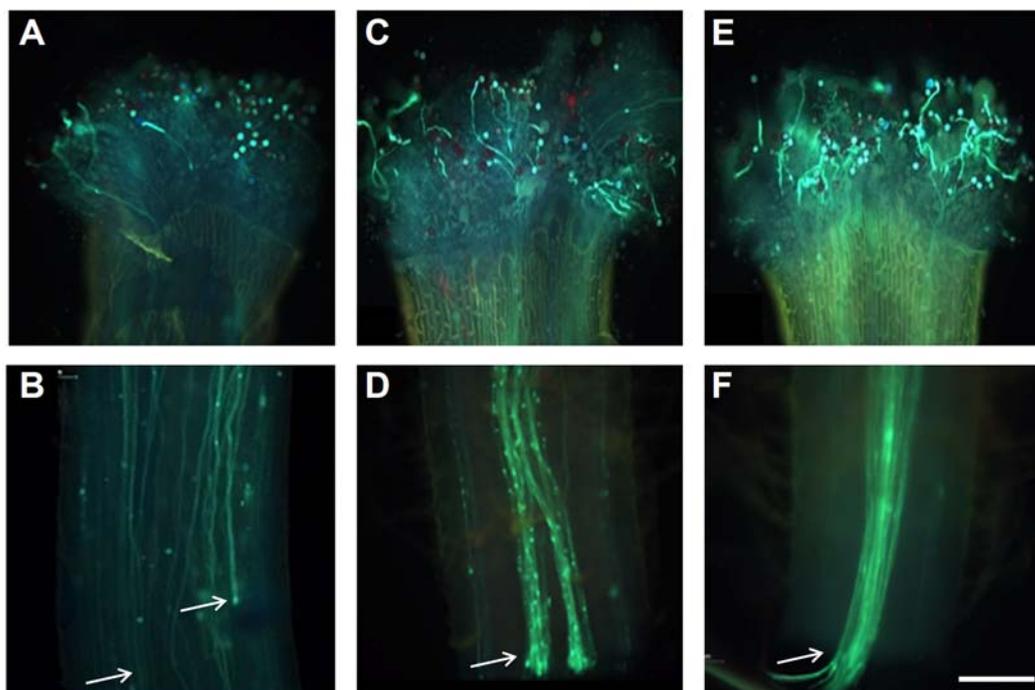


Figura 24. Ensayo de viabilidad *in vivo* de polen WT en pistilos de flores WT. Las imágenes se toman en el estigma de la flor (A, B y C) y en la zona de unión del estilo con el ovario (D, E y F) a las 8 (A y D), 24 (B y E) y 48 horas de haber realizado la polinización. Las flechas señalan la distancia alcanzada por algunos tubos polínicos. Escala de barras: 100 μ m

A las 8 horas de haber realizado la polinización, ya se veía que un elevado porcentaje de granos de polen WT habían germinado y muchos tubos polínicos habían alcanzado la zona basal del estilo de la flor WT, es decir, previsiblemente se había producido la fecundación de algún óvulo (figuras 24A y 24B). A las 24 y 48 horas de la polinización se veía un nutrido número de tubos polínicos que habían alcanzado la base del estilo y muy probablemente ya se había producido la fecundación de un elevado número de óvulos (figuras 24C-24F).

Por el contrario, cuando se polinizaban flores del mutante *Lfs2084-7* con el polen del mutante disminuían significativamente tanto la germinación como el desarrollo de los tubos polínicos (figura 25). A las 8 horas de la polinización, se veían algunos granos de polen *Lfs2084-7* germinados sobre el estigma (figura 25A), pero no se visualizaban tubos polínicos a lo largo del estilo de la flor *Lfs2084-7* (figura 25B). A las 24 horas aumentaba el número de granos de polen

que habían germinado, aunque no de manera significativa (figura 25C), y se veía algún tubo polínico que aún no había alcanzado la base del estilo (figura 25D). A las 48 horas no había aumentado significativamente el número de granos de polen *Lfs2084-7* germinados (figura 25E) y algún tubo polínico había alcanzado la base del estilo (figura 25F).

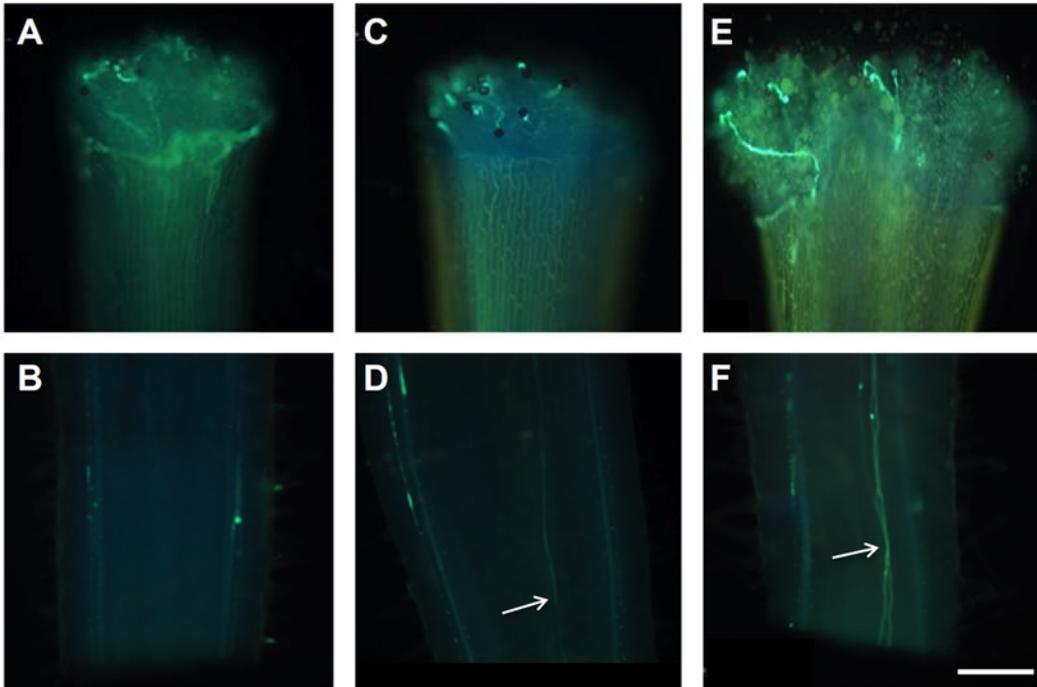


Figura 25. Ensayo de viabilidad *in vivo* de polen *Lfs2084-7* en pistilos de flores *Lfs2084-7*. Las imágenes se toman en el estigma de la flor (A, B y C) y en la zona de unión del estilo con el ovario (D, E y F) a las 8 (A y D), 24 (B y E) y 48 horas de haber realizado la polinización. Las flechas señalan la distancia alcanzada por algunos tubos polínicos.

Escala de barras: 100 µm

Para evaluar otros factores, como por ejemplo la recepción del polen por el estigma o factores dependientes del ovario receptor, que pudieran afectar a la germinación del polen o al desarrollo de los tubos polínicos, se realizaron polinizaciones recíprocas entre el WT y el mutante. Es decir, se polinizaron flores del mutante *Lfs2084-7* con el polen WT y, a la inversa, flores del WT con el polen mutante.

Los resultados indicaron que el polen WT era capaz de germinar y desarrollar tubos polínicos aparentemente normales en los ovarios del mutante (figura 26). A las 8 de la polinización se veían granos de polen WT germinados sobre el estigma mutante (figura 26A), aunque muchos menos que sobre el estigma WT (ver figura 24A). Además, a diferencia de lo que ocurría en las flores WT, se visualizaban menos tubos polínicos y estos aún no habían alcanzado la base del

estilo de la flor mutante (figura 26B). A las 24 horas de la polinización, un elevado número de granos de polen habían germinado (figura 26C) y algunos tubos polínicos habían alcanzado la base del estilo de la flor mutante (figura 26D). Sin embargo, la cantidad de tubos polínicos en la base del estilo de la flor mutante era significativamente menor que la que se había observado en las flores WT (ver figura 24D). A las 48 horas no se observaba un cambio significativo en el número de granos de polen germinados (figura 26E), pero sí que se podían visualizar muchos más tubos polínicos alcanzando la base del estilo (figura 26F).

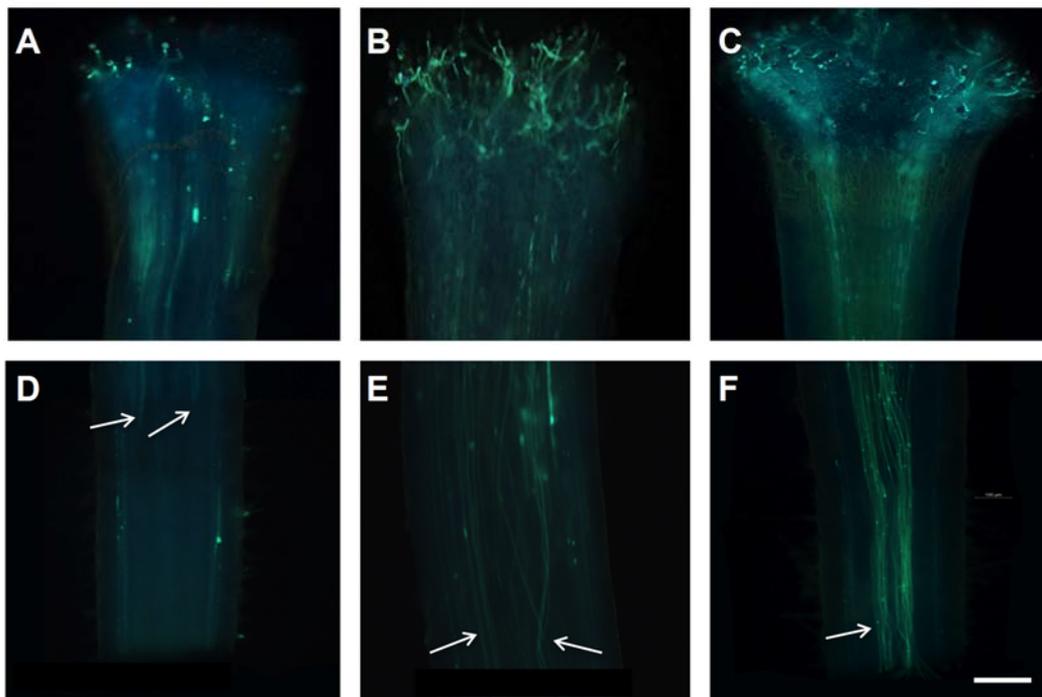


Figura 26. Ensayo de viabilidad *in vivo* de polen WT en pistilos de flores *Lfs2084-7*. Las imágenes se toman en el estigma de la flor (A, B y C) y en la zona de unión del estilo con el ovario (D, E y F) a las 8 (A y D), 24 (B y E) y 48 horas de haber realizado la polinización. Las flechas señalan la distancia alcanzada por algunos tubos polínicos.

Escala de barras: 100 μ m

Cuando se polinizaban flores del WT con el polen del mutante también disminuían significativamente tanto la germinación como el desarrollo de los tubos polínicos (figura 27), aunque en menor grado respecto a la polinización de flores del mutante con el polen mutante. Transcurridas 8 horas tras la polinización se veían granos de polen del mutante germinados sobre el estigma WT y algunos tubos polínicos a lo largo del estilo. Conviene recordar que en la polinización de flores mutantes con polen del mutante, los primeros tubos polínicos, que aún no alcanzaban la base del estilo, se visualizaron a las 24 horas (figura 25D). En cambio, el polen mutante fue capaz de alcanzar la base del estilo WT (i.e. había

llegado al ovario) a las 24 horas de la polinización (figura 27D). A las 48 horas, se visualizaban muchos más tubos polínicos alcanzando la base del estilo (figura 27F) respecto a lo que se observó en la polinización de flores mutantes con polen del mutante (figura 25F).

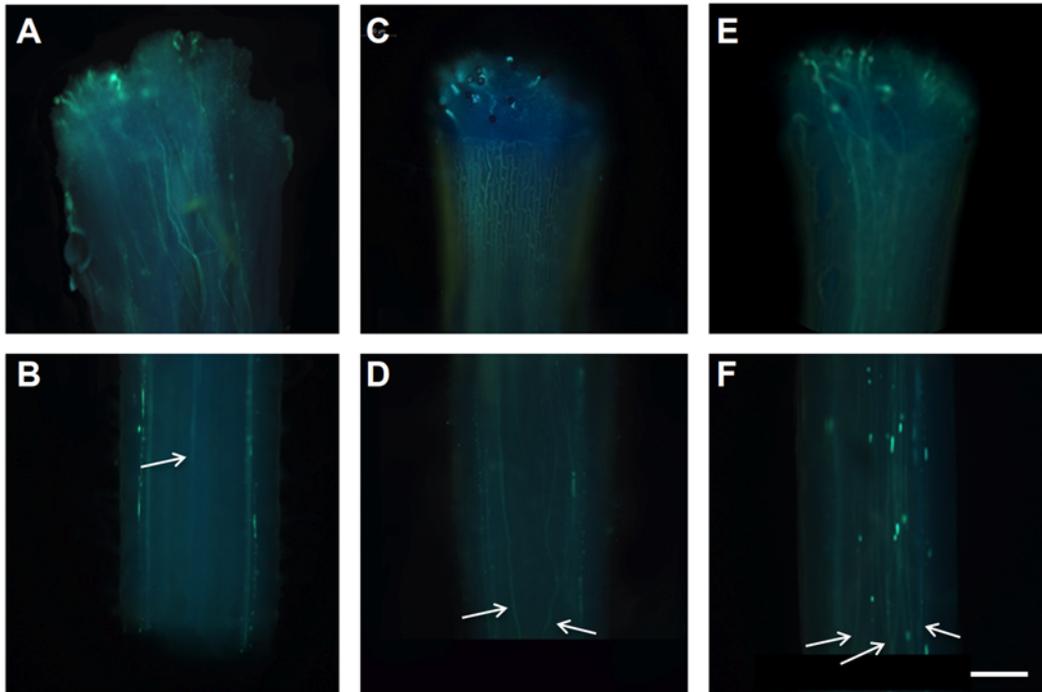


Figura 27. Ensayo de viabilidad *in vivo* de polen *Lfs2084-7* en pistilos de flores WT. Las imágenes se toman en el estigma de la flor (A, B y C) y en la zona de unión del estilo con el ovario (D, E y F) a las 8 (A y D), 24 (B y E) y 48 horas de haber realizado la polinización. Las flechas señalan la distancia alcanzada por algunos tubos polínicos.

Escala de barras: 100 μ m

Estos resultados sugieren una interacción entre el pistilo del mutante con el polen receptor, ya sea WT o mutante. En este sentido, parece que el número de granos de polen capaces de germinar en el estigma de las flores mutantes es menor respecto a lo que ocurre en el estigma de las flores WT. Además, el recorrido de los tubos polínicos a lo largo del estilo se ralentiza, es decir, los tubos polínicos alcanzan el ovario de las flores mutantes más tarde de lo que lo hacen los tubos polínicos en las flores WT. Por tanto, la menor tasa de cuajado podría estar mediada, en parte, por un menor porcentaje de polen viable. Sin embargo, los factores determinados por el ovario podrían tener tanto o más relevancia sobre la menor tasa de cuajado del mutante *Lfs2084* que la inviabilidad de la mitad de los granos de polen.

En definitiva, la mutación *Lfs2084* promueve la degeneración de los granos de polen que portan el inserto, pero afecta también al desarrollo reproductivo del ovario, lo que reduce de forma dramática la tasa de cuajado de fruto.

4.1.5. Contenido endógeno de algunas hormonas en el mutante *Lfs2084*

Para evaluar el efecto de la mutación sobre el contenido endógeno de hormonas se realizó un análisis en plantas WT y *Lfs2084*. Se vio que los niveles de ABA, GA1 y DHZ disminuían significativamente en el mutante, mientras que ocurría lo contrario con los contenidos de GA4 y Z (tabla 6). También vimos que el contenido de IAA era mucho mayor en el WT, pero la variabilidad entre las muestras hizo que las diferencias no resultaran significativas. Algo similar ocurrió con el JA, aunque en este caso el contenido más elevado se detectó en plantas mutantes.

Tabla 6. Contenido endógeno de ácido abscísico (ABA), jasmónico (JA), indolacético (IAA), giberelinas activas (GA1 y GA4), dihidroxizeatina (DHZ) y zeatina (Z) en el WT y el mutante *Lfs2084*. El análisis se llevó a cabo en hojas jóvenes completamente desarrolladas de plantas cultivadas en invernadero.

Los valores se expresan como la media \pm error estándar. Para cada hormona, * indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

ABA, JA e IAA se expresan en nanogramos (ng). GA1, GA4, DHZ y Z se expresan en picogramos (pg)

Línea	ABA (ng)	JA (ng)	IAA (ng)	GA1 (pg)	GA4 (pg)	DHZ (pg)	Z (pg)
WT	596,09 $\pm 43,13$ *	14,35 $\pm 7,41$	582,47 $\pm 560,65$	964,57 $\pm 71,88$ *	31,53 $\pm 1,58$	0,33 $\pm 0,07$ *	53,03 $\pm 4,05$
<i>Lfs2084</i>	458,04 $\pm 17,42$	76,80 $\pm 38,92$	26,36 $\pm 5,76$	142,47 $\pm 18,99$	50,13 $\pm 3,05$ *	0,00 $\pm 0,00$	120,43 $\pm 23,27$ *

Las mayores concentraciones de JA y citoquininas (Z) podrían promover mayor densidad de tricomas (Glas et al, 2012), dos caracteres que hemos observado en las plantas mutantes. Por otro lado, los mayores niveles de GA1 en el WT son coherentes con la menor tasa de cuajado de fruto, teniendo en cuenta que esta giberelina es la forma activa que promueve la inducción del crecimiento del fruto de tomate durante el proceso de cuajado (Serrani et al, 2007). Además, aunque las diferencias no resultaron significativas, el menor contenido de IAA en el mutante se puede relacionar con una menor tasa de cuajado, habida cuenta del papel que tiene esta hormona en el proceso de cuajado del fruto de tomate (Mariotti et al, 2011). Los resultados del análisis de hormonas sugieren, además, una alteración de la ruta MEP (2-C-metil-D-eritritol-4 fosfato) que conduce a la síntesis de GAs, citoquininas y ABA. Estos resultados se comentarán con más detalle en el apartado de Discusión.

4.1.6. Expresión de genes implicados en el cuajado de fruto

Se utilizaron ovarios en tres estadios del desarrollo floral (pre-antesis, antesis y post-antesis) para realizar análisis comparativos de expresión que nos permitieran detectar interacciones genéticas entre la mutación *Lfs2084* y otros genes de tomate implicados en el desarrollo reproductivo y el cuajado de fruto.

Se analizaron los niveles de transcrito de algunos genes implicados en la inactivación de las giberelinas (*SIGA2ox1* y *SIGA2ox2*). No se detectaron cambios significativos en la expresión del gen *SIGA2ox1* (figura 28A). Sin embargo, los niveles de transcritos de *SIGA2ox2* en los estadios de antesis y post-antesis fueron significativamente mayores en el mutante *Lfs2084* (figura 28B).

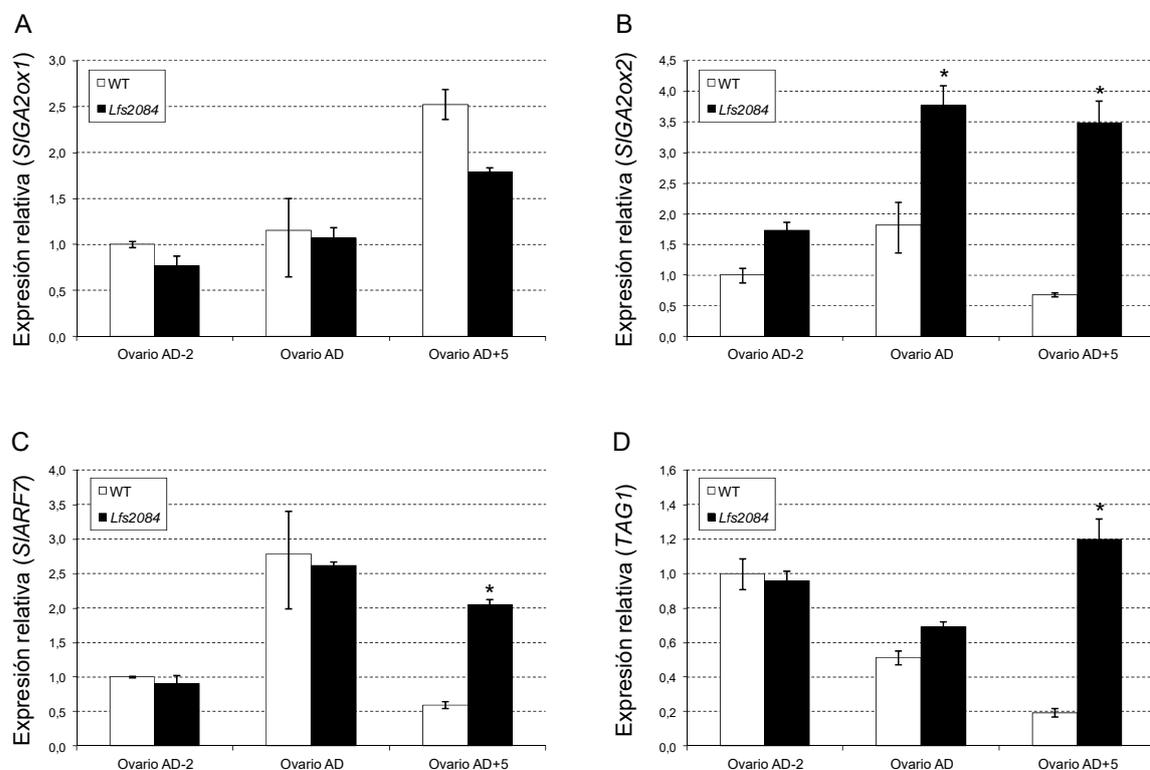


Figura 28. Expresión relativa de los genes *SIGA2ox1*, *SIGA2ox2*, *SIARF7* y *TAG1* en ovarios del WT y del mutante *Lfs2084* en estadios de pre-antesis (2 días previos a la antesis), antesis y post-antesis (5 días posteriores a la antesis).

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

También se analizó la expresión de uno de los genes de la ruta de señalización de auxina (*SIARF7*) que participa en el control del inicio del desarrollo del fruto. En los estadios de pre-antesis y antesis no se detectaron diferencias entre el WT y el mutante. Sin embargo, los niveles de transcrito de *SIARF7* en el estadio de post-antesis eran significativamente mayores en el mutante (figura 28C). Conviene indicar que en el mutante, *SIARF7* no

experimentó prácticamente cambios en los niveles de expresión entre los estadios de antesis y post-antesis. En el WT, sin embargo, este gen disminuyó significativamente su expresión respecto a los niveles que exhibía en el estadio de antesis (figura 28C).

Además, se analizó el nivel de expresión del gen MADS box *Tomato Agamous 1* (*TAG1*). Al igual que ocurría con *SIARF7*, en los estadios de pre-antesis y antesis no se detectaron diferencias de expresión de *TAG1* entre el WT y el mutante; sin embargo, los niveles de transcrito de *TAG1* fueron significativamente mayores en el mutante en el estadio de post-antesis. Conviene indicar que detectamos mayores niveles de expresión de *TAG1* en el estadio de post-antesis que en los estadios de pre-antesis y antesis (figura 28D).

Los cambios detectados en los niveles de expresión de los genes que se han evaluado son coherentes con la menor tasa de cuajado del mutante como se detallará en el apartado de Discusión.

4.2. Lower fruit setting 2448 (Lfs2448): comentarios previos

El escrutinio de líneas de T-DNA de tomate que se generaron en el contexto de esta Tesis Doctoral nos permitió identificar un nuevo mutante dominante afectado en la tasa de cuajado de fruto al que denominamos Lower fruit setting 2448 (Lfs2448). A diferencia de lo que le ocurría al mutante *Lfs2084*, en el que prácticamente no cuajaban frutos, en *Lfs2448* la conversión de ovario a fruto no se encontraba inhibida, pero la tasa de cuajado era muy baja respecto a la del WT. Aunque se obtenían frutos de autofecundación a partir de *Lfs2448* decidimos caracterizar plantas procedentes del retrocruce con el WT, toda vez que este tipo de progenies permite llevar a cabo la caracterización genética de un mutante dominante de forma más rápida y eficaz que la progenie de autofecundación.

4.2.1. Caracterización del mutante *Lfs2448*

La caracterización de *Lfs2448* se llevó a cabo con 67 plantas procedentes del retrocruce entre el WT y el mutante. Antes de transferirlas al invernadero, se analizó la resistencia a la kanamicina de cada una de las plantas para determinar el número de insertos funcionales del mutante.

Tabla 7. Análisis genético y fenotípico del mutante *Lfs2448*. Fenotipos detectados en la progenie de retrocruce (i.e. plantas WT y *Lfs2448*), y determinación del número de flores y frutos por inflorescencia, tasa de cuajado, resistencia o sensibilidad a la kanamicina (Km) de las plantas WT y *Lfs2448*, y análisis χ^2 de las segregaciones observadas (nótese que las segregaciones son idénticas para los caracteres evaluados, es decir, fenotipo y resistencia a la kanamicina).

Los valores se expresan como la media \pm error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

	WT (♂)	(X)	<i>Lfs2084</i> (♀)
		↓	
Fenotipos de la BC1	39 WT		28 <i>Lfs2084</i>
Flores / inflorescencia	$12,6 \pm 0,6$ (a)		$13,9 \pm 1,3$ (a)
Frutos / inflorescencia	$3,6 \pm 0,3$ (a)		$1,7 \pm 0,2$ (b)
Tasa de cuajado (%)	$28,6 \pm 2,4$ (a)		$12,3 \pm 1,5$ (b)
Observado Km ^R : Km ^S	0 Km ^R : 39 Km ^S		28 Km ^R : 0 Km ^S
Análisis de la χ^2 (1:1)	$1,81$ ($< \chi^2_{1 \text{ g.l.}}(5\%) = 3,84$)		

Como se puede ver en la tabla 7, la mitad de la progenie del retrocruce entre el mutante y el WT exhibía menor tasa de cuajado, es decir, los datos se ajustaron a una segregación fenotípica 1 WT : 1 *Lfs2448*. El número de flores por inflorescencia fue similar en las plantas mutantes y en las WT; sin embargo, en

Lfs2448 cuajaron significativamente menos frutos por inflorescencia, es decir, la tasa de cuajado era significativamente menor (tabla 7, figuras 29C y 29D). Lo más interesante fue que en todas las plantas mutantes se detectó un sólo inserto de T-DNA. En efecto, como se puede ver en la tabla 7 todas las plantas de fenotipo WT fueron sensibles a la kanamicina mientras que las mutantes fueron resistentes (segregación 1 : 1). Este resultado indicaba la existencia de co-segregación entre el único inserto funcional y la mutación.

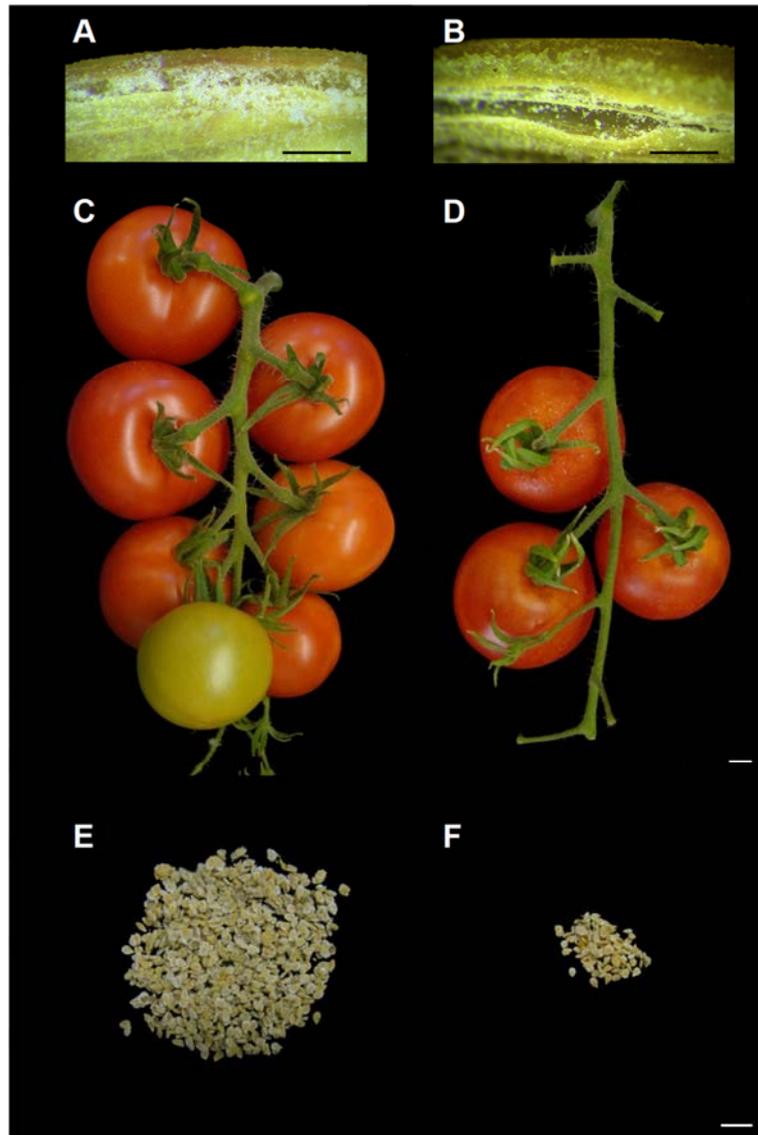


Figura 29. Caracteres del desarrollo reproductivo en el WT y el mutante *Lfs2448*. Zona de deshiscencia de la antera en el WT (A) y en *Lfs2448* (B). Inflorescencia con frutos maduros en el WT (C) y en *Lfs2448* (D). Semillas de 10 frutos WT (E) y 10 frutos *Lfs2448* (F).

Escala de barras: 0,5 mm en A y B, 1 cm en C, D, E y F.

Por otro lado, no se observaron diferencias relevantes en caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo (i.e. tamaño, morfología o color de las hojas, así como caracteres relacionados con el porte o la arquitectura vegetativa de la parte aérea). Las flores de las plantas WT y del mutante eran similares en tamaño y morfología. Sin embargo, las anteras de las flores de *Lfs2448* parecían contener menos polen que las del WT (figuras 29A y 29B). Además, pudimos comprobar que los frutos de las plantas BC1 de fenotipo *Lfs2448* daban mucha menos semilla que los de las plantas BC1 de fenotipo WT. En promedio, cada fruto WT contenía unas 18-19 semillas mientras que los frutos mutantes solían tener unas 6-7 semillas cada uno (figuras 29E y 29F).

En definitiva, los resultados de la caracterización genética y fenotípica revelaron que la mutación *Lfs2448* era insercional y promovía menor cuajado de fruto. Conviene recordar que la caracterización del mutante se llevó a cabo en plantas heterocigóticas para el alelo mutante (plantas BC1). El objetivo del siguiente experimento era evaluar el fenotipo de las plantas homocigóticas para la mutación, en aras de ver si la tasa de cuajado de estas plantas era aún más baja que la que habíamos observado en las heterocigóticas. Para ello, caracterizamos las progenies de autofecundación de las plantas mutantes BC1.

4.2.2. Caracterización de progenies procedentes de la autofecundación del mutante *Lfs2448*

Se analizaron 5 progenies que procedían de la autofecundación de las plantas mutantes BC1 del anterior experimento. Antes de transferirlas al invernadero, se analizó el carácter resistencia a la kanamicina de cada una de las progenies para comprobar que segregaban acorde a lo esperado, es decir, la progenie de autofecundación de una planta de copia simple de T-DNA (i.e. 1 sólo inserto) debería exhibir un patrón de herencia mendeliano monogénico dominante para el carácter resistencia a la kanamicina, a saber, 3 plantas resistentes a la kanamicina y 1 sensible. Sin embargo, los resultados del análisis revelaron que todas las líneas se ajustaban a una segregación 1 : 1 (i.e. 1 planta resistente a la kanamicina y 1 sensible, tabla 8). Estas segregaciones pueden estar ocasionadas por dos fenómenos distintos: 1) Silenciamiento del inserto funcional en homocigosis; 2) ausencia de individuos homocigóticos para la mutación debido a la letalidad de uno de los dos gametos (figuras 30.1 y 30.2).

Tabla 8. Resistencia o sensibilidad a la kanamicina (Km) en progenies de autofecundación de plantas mutantes; y análisis χ^2 de las segregaciones 3 Km^R :1 Km^S y 1 Km^R :1 Km^S.

Notas: 1) Las plantas mutantes (i.e. *Lfs2448-5*, 6, 19, 20 y 23) se obtuvieron en el retrocruce entre el mutante dominante y el WT (tabla 7).

2) χ^2 t 1 g.l. (5%) = 3,84

Progenies \otimes	Km ^R	Km ^S	χ^2 (3R : 1S)	χ^2 (1R : 1S)
<i>Lfs2448-5</i>	11	9	4,27 *	0,20
<i>Lfs2448-6</i>	32	26	12,16 *	0,62
<i>Lfs2448-19</i>	8	9	7,08 *	0,06
<i>Lfs2448-20</i>	26	19	7,12 *	1,09
<i>Lfs2448-23</i>	13	13	8,67 *	0,00

Para ilustrar la distorsión de las segregaciones observadas en *Lfs2448* de una forma gráfica, representaremos el único inserto de T-DNA con la letra A, y el locus WT con esa letra minúscula (a). Por tanto, una planta transgénica con un único inserto de T-DNA tendrá el 50% de sus granos de polen con T-DNA (A) y el otro 50% sin T-DNA (a); y lo mismo ocurrirá en los óvulos (figura 30).

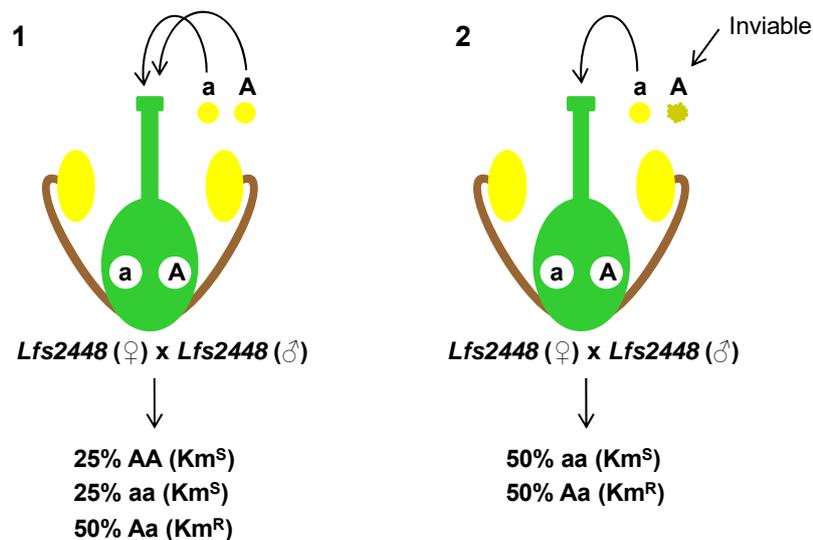


Figura 30. Autofecundación de una planta mutante (i.e. *Lfs2448-5*) con 1 inserto funcional (A). 1) Las plantas homocigóticas para el inserto exhiben silenciamiento génico y son sensibles a la kanamicina al igual que las que no contienen el inserto (25% + 25%), mientras que el otro 50% contiene el inserto funcional en hemocigosis y es resistente a la kanamicina. 2) El polen del mutante con el inserto funcional es inviable, por tanto, el 50% de la progenie no contiene el inserto funcional y es sensible a la kanamicina mientras que el otro 50% contiene el inserto funcional y es resistente a la kanamicina.

Nota: la figura 30.2 ilustra una segregación 1:1 sobre la base de la letalidad del gameto masculino. Conviene indicar que estos resultados se podrían también obtener si la letalidad ocurre en el gameto femenino.

Las progenies *Lfs2448-5* y *Lfs2448-23* (tabla 8) se llevaron al invernadero para observar el fenotipo de las plantas resistentes y sensibles a la kanamicina. Vimos que todas las plantas sensibles exhibían fenotipo WT mientras que las resistentes tenían el fenotipo *Lfs2448*, es decir, desarrollaban menos frutos por inflorescencia, parecía que las anteras tenían menos polen (figura 31) y los frutos contenían menos semillas. Estos resultados parecían indicar que las segregaciones que se habían observado en las progenies de autofecundación (i.e. 1 Km^R : 1Km^S) se debían a la inviabilidad del polen transgénico y no al silenciamiento del inserto funcional o a la inviabilidad de los óvulos transgénicos (figura 30.2). Para confirmarlo, en el siguiente experimento evaluamos el efecto de la mutación sobre el desarrollo del polen.



Figura 31. Comparación entre la cantidad de polen extraído de una flor WT respecto al extraído a partir de dos flores *Lfs2448*.

4.2.3. Pruebas de viabilidad del polen *in vitro* y análisis histológicos en flores

Realizamos un análisis de viabilidad de polen *in vitro* con acetato de carmín en flores de plantas WT y del mutante *Lfs2448*. Los resultados del análisis indicaban que aproximadamente la mitad de los granos de polen del mutante *Lfs2448* era aberrante y no se teñía (figura 32B). Estas anomalías, que no se observaron en los granos de polen del WT (figura 32A), parecían confirmar que la causa de las segregaciones de las progenies de autofecundación (i.e. 1 Km^R : 1Km^S) era la inviabilidad del polen portador del inserto responsable de la

mutación, más que un fenómeno de silenciamiento génico de los individuos con el inserto en homocigosis.

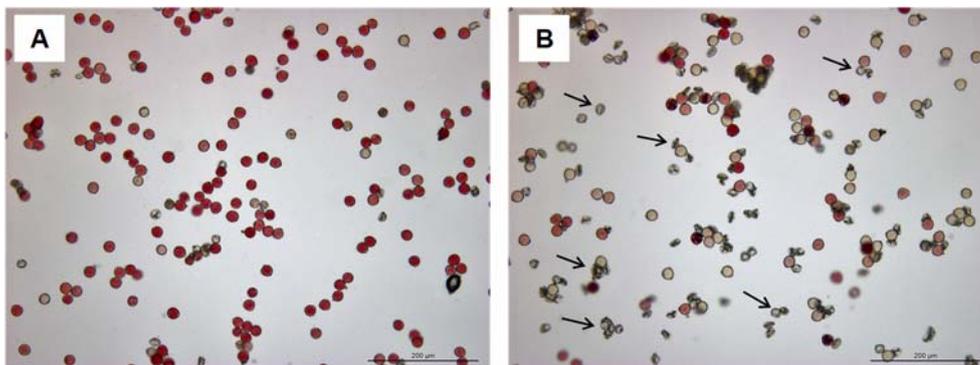


Figura 32. Análisis *in vitro* de viabilidad del polen con acetato de carmín en el WT (A) y *Lfs2448* (B). Aproximadamente, el 50% del polen del mutante es aberrante (las flechas señalan algunos granos de polen anómalos).

Estos resultados se confirmaron mediante un análisis de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA). En microscopía de fluorescencia pudimos ver que un elevado número de granos de polen del WT exhibían una fluorescencia verde intensa, es decir, se trataba de granos de polen viables (figura 33B). Sin embargo, el número de granos de polen viable del mutante era, sobre la base de la fluorescencia, significativamente menor (figura 33D).

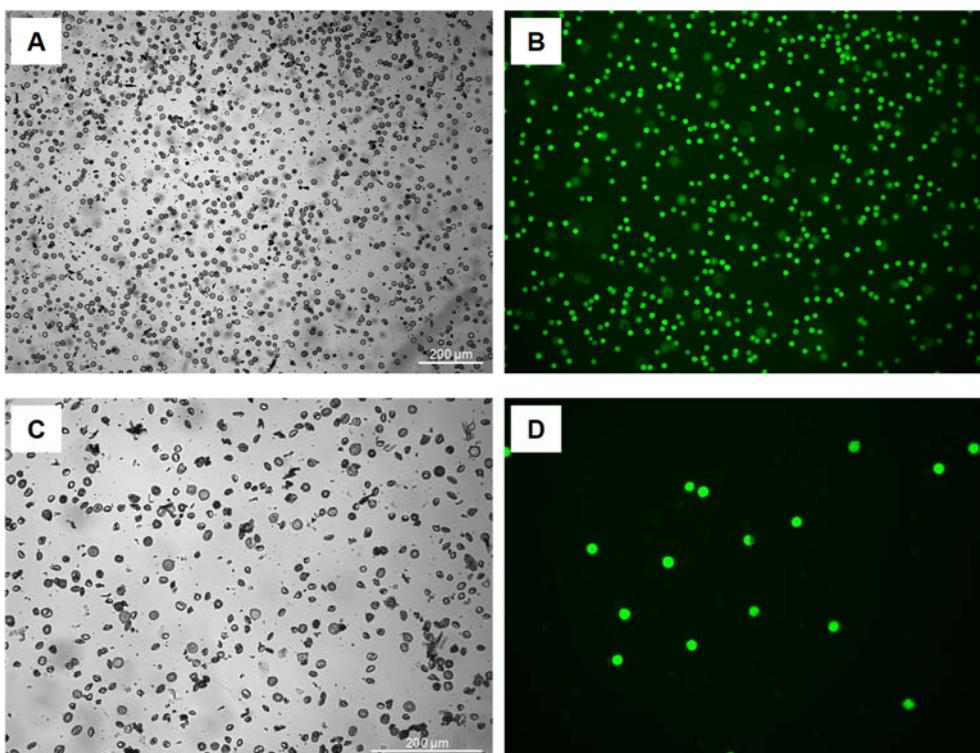


Figura 33. Análisis *in vitro* de viabilidad del polen con FDA en el WT (A y B) y *Lfs2448* (C y D). Visualización de los granos de polen en campo claro (A y C) y en fluorescencia a una longitud de onda de 490 nm (B y D).

En conjunto, los resultados de los análisis de viabilidad de polen *in vitro* (i.e. con acetato de carmín y FDA) indicaban la degeneración de un elevado porcentaje de granos polen en las plantas mutantes.

Con el objeto de profundizar en el análisis del mutante y determinar en qué momento de la androgénesis se producía la degeneración de los granos de polen, se evaluaron diferentes estadios de desarrollo floral mediante tinción con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Concretamente, los estadios florales en los que el polen se encuentra en etapa de tétrada, microspora vacuolada, polen medio, polen joven y polen maduro, y que corresponden con flores en los estadios de botón floral de 5 mm (BF1), botón floral de 7 mm (BF2), botón floral de 9 mm (BF3), pre-antesis y antesis (figura 34).

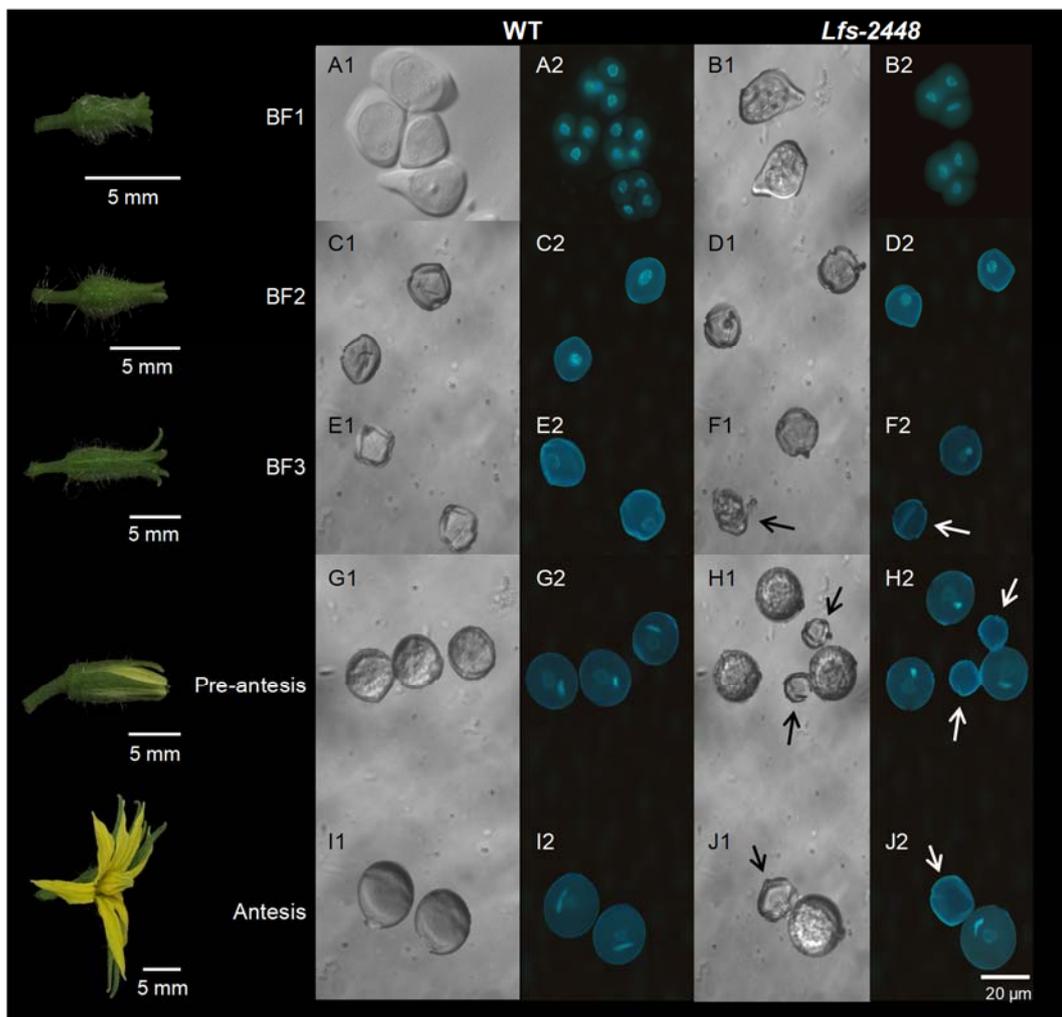


Figura 34. Caracterización del desarrollo del polen mediante tinción con DAPI en el WT y el mutante *Lfs2448* en estadios de tétrada (botón floral de 5 mm), microspora vacuolada (botón floral de 7 mm), polen medio (botón floral de 9 mm), polen joven (pre-antesis) y polen maduro (antesis). Las flechas señalan granos de polen inviables.

En los estadios de BF1 y BF2 no fuimos capaces de detectar diferencias entre el WT y el mutante, aunque, en general, observamos que en el mutante se teñían muchas menos células (tétradas o microsporas). Empezamos a observar diferencias claras a partir del estadio de BF3. En esta etapa del desarrollo floral, los granos de polen del WT, a pesar de ser irregulares, comienzan a adquirir una morfología más o menos esférica (figuras 34E1 y 34E2). Sin embargo, algunos de los granos de polen del mutante tenían una morfología más irregular y eran de menor tamaño (figuras 34F1 y 34F2). En los estadios de pre-antesis y antesis se veían claramente las diferencias entre el WT y el mutante (figuras 34G-34J). En el mutante se observó un notable incremento en el número de granos de polen de menor calibre (figuras 34H y 34J). Además, la tinción con DAPI en los granos de polen viables permitía visualizar los núcleos vegetativo y generativo, gracias a su alta afinidad por el ADN (figuras 34G-34J). Estos núcleos no se veían en los granos de polen inviables del mutante (ver figuras 34H y 34J, polen señalado con flechas).

Los análisis mediante histología y microscopía permitieron determinar que la degeneración de los granos de polen se producía desde los primeros estadios del desarrollo que habíamos evaluado. En efecto, desde la etapa de tétrada se detectó un alto porcentaje de células que tenían una morfología ligeramente distinta y coloración más tenue (figura 35).

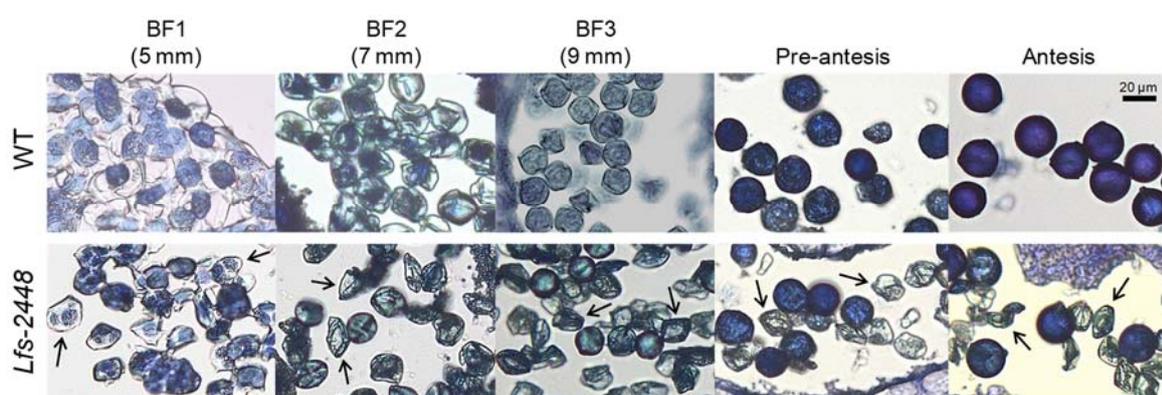


Figura 35. Desarrollo del polen mediante histología en el WT y el mutante *Lfs2448* en estadios de tétrada (botón floral de 5 mm), microspora vacuolada (botón floral de 7 mm), polen medio (botón floral de 9 mm), polen joven (pre-antesis) y polen maduro (antesis). Las flechas señalan algunos granos de polen inviables.

La degeneración del polen del mutante era especialmente evidente en las etapas de pre-antesis y antesis. En estos estadios del desarrollo floral, los granos de polen del WT eran de morfología esférica y exhibían una fuerte tinción azul

mientras que un alto porcentaje (~ 50%) de los del mutante eran de morfología irregular y no exhibían tinción (figura 35).

El análisis histológico de los ovarios reveló la ausencia de alteraciones en los tejidos que lo componen. Tampoco se observaron diferencias entre el WT y el mutante ni en el tamaño ni en la morfología de los óvulos (figura 36).

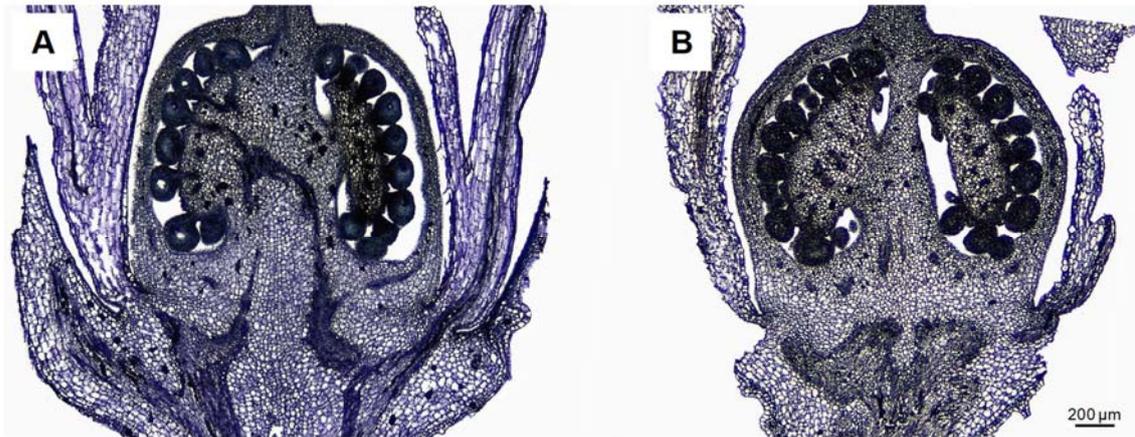


Figura 36. Detalle de los ovarios del WT y del mutante *Lfs2448* en estadio de antesis.

En definitiva, el análisis histológico indicó que la mutación *Lfs2448* promueve la degeneración del polen (~50%) desde estadios tempranos del desarrollo floral, pero no parece afectar al sistema reproductor femenino de la flor de tomate.

4.2.4. Análisis de viabilidad del polen *in vivo*

Para ver la germinación de los granos de polen sobre el estigma de la flor y el desarrollo de los tubos polínicos a lo largo del estilo se realizó un análisis de la viabilidad del polen *in vivo*. Realizamos polinizaciones manuales con polen WT sobre flores WT y con polen del mutante *Lfs2448* sobre flores del mutante, y observamos la germinación de granos de polen y el avance de los tubos polínicos a lo largo del estilo de la flor.

Como se puede ver en la figura 37A, 24 horas después de la polinización había germinado un elevado porcentaje de polen WT sobre el estigma de la flor WT y un elevado número de tubos polínicos progresaban a lo largo del estilo. En el mutante también observamos la germinación de granos de polen sobre el estigma y el desarrollo de tubos polínicos a lo largo del estilo de las flores *Lfs2448* (figura 37B). Sin embargo, tanto la cantidad de granos de polen germinados sobre el estigma como el número de tubos polínicos que progresaban por el estilo eran significativamente menores en el mutante (figura 37A vs figura 37B). Los

resultados sugieren que la menor cantidad de polen funcional en el mutante afecta al proceso normal de polinización.

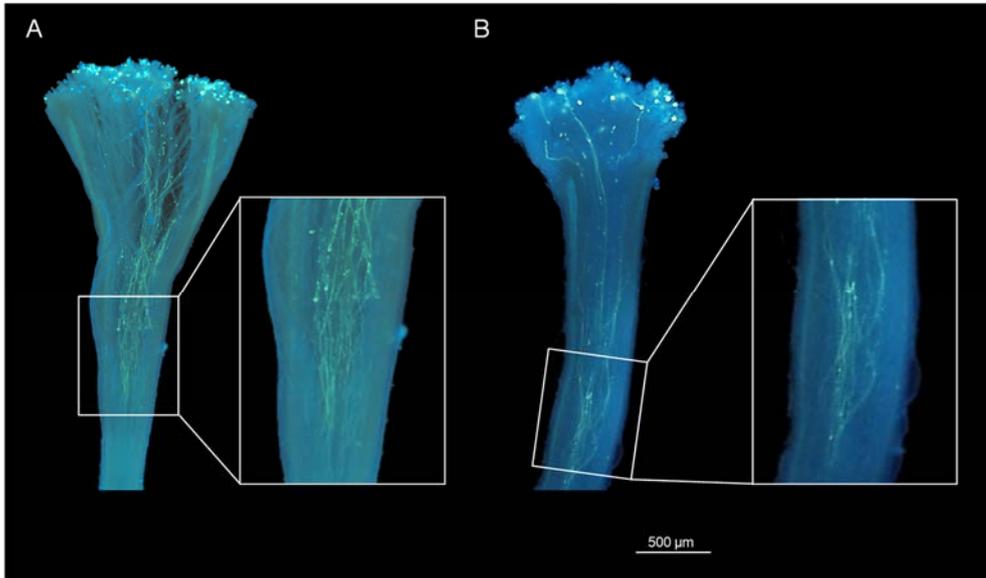


Figura 37. Ensayo de viabilidad *in vivo* de polen a las 24 horas de la polinización. A) Germinación y desarrollo de polen WT en pistilos WT. B) Germinación y desarrollo de polen *Lfs2448* en pistilos *Lfs2448*.

4.2.5. Caracterización molecular de la mutación *Lfs2448*.

Toda la caracterización molecular de *Lfs2448* se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Lozano (Universidad de Almería). Mediante Anchor-PCR se clonaron las regiones genómicas flanqueantes al inserto de T-DNA. El análisis bioinformático de las secuencias flanqueantes indicó que el T-DNA se localizaba en la región intergénica de dos genes que codifican proteínas citocromo P450 (CYP450), a los que denominamos *LFS2448.1* (*LFS1*) y *LFS2448.2* (*LFS2*).

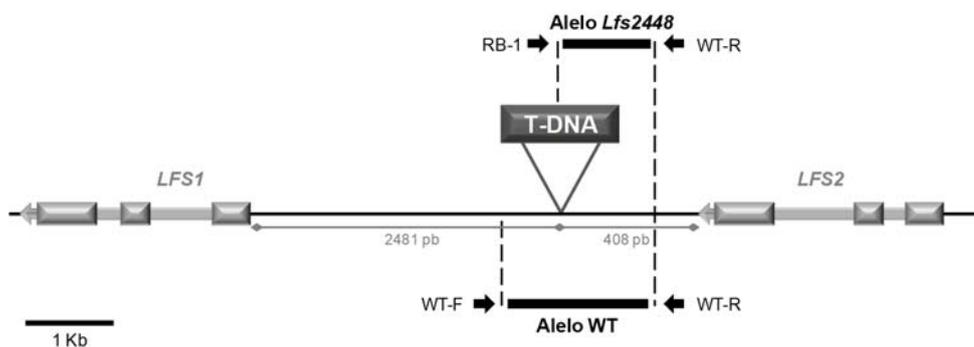


Figura 38. Representación esquemática de la localización genómica del inserto T-DNA en la línea mutante *Lfs2448*. Se muestra el conjunto de cebadores utilizados para la amplificación del alelo silvestre (WT-Forward o WT-F y WT-Reverse o WT-R) y mutante (Rigth Border-1 o RB-1 y WT-Reverse o WT-R) en la progenie segregante. Las cajas grises representan los exones, y entre ellas (línea gruesa gris) los intrones, y las flechas señalan el sentido de la transcripción (imagen cedida por el Dr. Lozano, Universidad de Almería).

La figura 38 ilustra la inserción del T-DNA, 2481 pares de bases (pb) corriente abajo del codón de inicio de *LFS1* y 408 pb corriente arriba del codón de parada de *LFS2* (Fernández, 2017). Con las secuencias genómicas flanqueantes al T-DNA se diseñaron cebadores específicos para realizar el genotipado de una población segregante procedente de la autofecundación de una planta mutante. Para evaluar la presencia del alelo silvestre (WT) se emplearon cebadores de la secuencia genómica donde se ubica el inserto T-DNA, mientras que para detectar el alelo mutante se utilizó, además de uno de los cebadores usados para amplificar el alelo WT, un cebador del T-DNA (figura 38). Esto permite comprobar si las plantas portan el inserto responsable de la mutación en homocigosis, hemicigosis o acigosis. En este sentido, las plantas acigóticas deben amplificar sólo el alelo WT, las hemicigóticas tanto el alelo WT como el alelo mutante y las homocigóticas sólo el alelo mutante. El análisis de 20 plantas de la población segregante obtenida a partir de la autofecundación de una planta mutante indicó que 11 plantas (que exhibían fenotipo WT en invernadero) sólo amplificaban el alelo WT, mientras que las otras 9 (que exhibían fenotipo mutante en invernadero) amplificaban tanto el alelo WT como el mutante (figura 39).

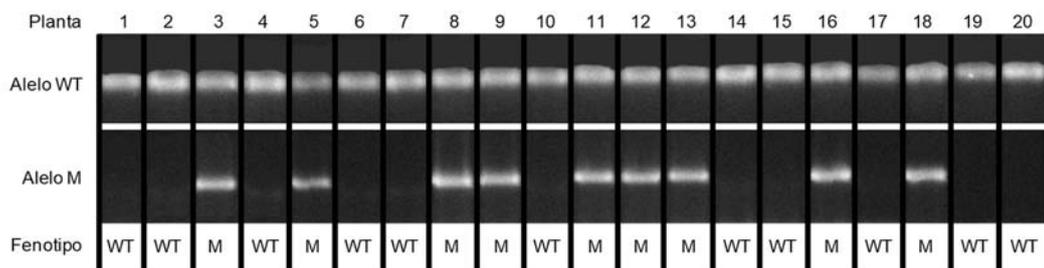


Figura 39. Co-segregación entre el inserto de T-DNA y el fenotipo mutante (M) *Lfs2448*. El análisis se realizó en una población segregante procedente de la autofecundación de una planta mutante. En invernadero, las plantas 1, 2, 4, 6, 7, 10, 14, 15, 17, 19 y 20 tenían fenotipo WT y eran acigotas para el inserto de T-DNA, mientras que las plantas 3, 5, 8, 9, 11, 12, 13, 16 y 18, de fenotipo mutante, eran hemicigotas para el inserto de T-DNA (imagen cedida por el Dr. Lozano, Universidad de Almería).

Los resultados indicaban la existencia de co-segregación entre el inserto de T-DNA y la mutación, como previamente habíamos observado en el análisis genético y fenotípico (tabla 7). Además, confirmaban que la mutación *Lfs2448* ocasiona letalidad del gameto masculino, puesto que el genotipado de la población segregante evidenció la ausencia de plantas homocigóticas para el inserto de T-DNA.

El análisis de expresión *in silico* de los genes etiquetados que se realizó en la Universidad de Almería indicó que *LFS1* y *LFS2* se expresan mayoritariamente en botones florales y frutos de 1 cm, lo que sugiere que estos genes deben desempeñar un papel relevante en el desarrollo reproductivo de tomate. El fenotipo observado en el mutante *Lfs2448* podría deberse a la alteración de la función de uno de los dos genes (*LFS1* o *LFS2*), o la de ambos. Actualmente, se está analizando la expresión de estos dos genes en plantas de fenotipo mutante para detectar los cambios que se producen en los niveles de transcrito respecto al WT. En los próximos meses iniciaremos la caracterización funcional de los dos genes, lo que nos proporcionará una valiosa información sobre la función que desempeñan los genes *CYP450* (*LFS1* o *LFS2*) durante el proceso de cuajado del fruto de tomate.

4.3. Arlequín: Antecedentes

Arlequín (*Alq*) es un mutante insercional de tomate cuyo carácter más relevante es la conversión homeótica de los sépalos en órganos suculentos que maduran como un fruto (figura 40). Pineda et al (2010) demostraron que *Arlequín* es una mutación de naturaleza semidominante promovida por la presencia de una inserción única del T-DNA. Los estudios morfológicos, estructurales y metabólicos realizados en los sépalos de *Arlequín* revelaron que éstos tienen una capacidad intrínseca para cambiar su programa de desarrollo y convertirse en órganos análogos a un fruto. Estos cambios de identidad celular se ven acompañados por profundos cambios metabólicos. La absorción

de agua, acumulación de materia seca y actividad sacarolítica, con la subsiguiente acumulación de glucosa y fructosa, sugieren que los sépalos del mutante se convierten en órganos con capacidad de sumidero, al igual que ocurre con los frutos verdaderos. Es más, se observó que los cálices *Arlequín* actúan como sumideros independientes del fruto verdadero toda vez que el cuajado y la conversión en frutos de los sépalos ocurren con independencia de que se produzca o no el cuajado de fruto verdadero, y que el desarrollo y maduración del cáliz y fruto verdadero se produce de forma asincrónica. Además, liberan etileno, tal y como sucede en un fruto climatérico, y viran a color rojo como consecuencia de la acumulación de licopeno, lo que indica que experimentan un proceso de maduración (Pineda et al, 2010).

En las plantas homocigóticas para el fenotipo mutante se observó que *Arlequín* promueve cambios en la morfología del fruto como consecuencia de una alteración en la zona de ablación del estilo. También se comprobó en estas plantas que tanto los frutos normales (i.e. derivados del ovario) como los que proceden de los sépalos exhiben caracteres de calidad excepcionales para el consumo en fresco y, sobre todo, para el procesado industrial. En este sentido, los niveles de azúcares, licopeno, y el contenido en grados Brix son

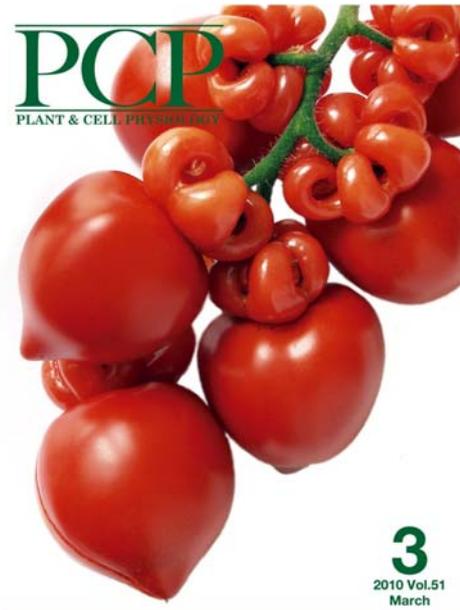


Figura 40. Portada de Plant and Cell Physiology (Volumen 51, 2010). Racimo de frutos del mutante *Arlequín*. Sus sépalos comparten las características de un fruto verdadero.

significativamente mayores en los frutos del mutante. Además, la mutación *Arlequín* confiere como ventaja adicional la inhibición de la zona de abscisión del fruto, lo que facilita la recolección mecánica (Pineda et al, 2010).

La caracterización molecular del mutante reveló que los cambios en el patrón del desarrollo de los sépalos de *Arlequín* se deben a una expresión ectópica del gen MADS-box *ARLEQUÍN (ALQ) / TAGL1*, secuela de la inserción de un T-DNA truncado en un dominio regulador de la transcripción de dicho gen (Giménez et al, 2010). El análisis funcional de *ALQ* indicó que el gen desempeña un papel clave en el proceso de maduración (Vrebalov et al, 2009, Itkin et al, 2009, Giménez et al, 2010). Con todo, los patrones de expresión de *ALQ* en plantas WT sugerían que este gen podría actuar como un factor de enlace entre las diferentes etapas del desarrollo reproductivo (desde el desarrollo floral hasta la maduración del fruto), permitiendo que este complejo proceso concluya con éxito (Giménez et al, 2010). Resultados recientes han confirmado esta hipótesis demostrando nuevas contribuciones del gen *ALQ* en el programa de desarrollo reproductivo de tomate. En este sentido, *ALQ* también desempeña un papel relevante en el desarrollo de la cutícula, probablemente a través de la actividad biosintética de las células epidérmicas (Giménez et al, 2015); además, de forma redundante junto con *TAG1*, está implicado en la formación del polen (Giménez et al, 2016).

4.3.1. La expresión ectópica de *ALQ* altera el patrón de crecimiento vegetativo.

El cultivo de *Arlequín* a lo largo de diferentes campañas ha permitido observar un patrón de crecimiento vegetativo más vigoroso que el que exhiben las líneas hermanas que carecen de la mutación (líneas acigóticas para el T-DNA). Para verificar estas observaciones, llevamos a cabo una caracterización del desarrollo vegetativo a lo largo del tiempo en el mutante y en plantas WT, tanto en condiciones de invernadero como en cultivo *in vitro*.

En invernadero evaluamos la altura de las plantas a partir de los 25 días. En ese estadio de desarrollo las plantas habían alcanzado aproximadamente 10 cm de altura y desarrollado 2 hojas verdaderas. En el momento en el realizamos las primeras mediciones no detectamos diferencias significativas en la altura; sin embargo, a los 4 días de la primera medición, las plantas WT eran ligeramente más altas que las plantas *Alq* y las diferencias resultaron significativas (figura 41A). En la siguiente medición, realizada a los 16 días, las plantas *Alq* ya eran

significativamente más altas que las WT, ya que alcanzaban una altura de 22 cm respecto a los 17 cm de altura de las WT. A los 29 días, las plantas *Alq* casi duplicaban la altura de las WT (figuras 41A y 41B). Las dos últimas mediciones las realizamos a los 42 y 52 días, y para entonces las plantas *Alq* superaban en más del doble la altura de las WT (figura 41A).

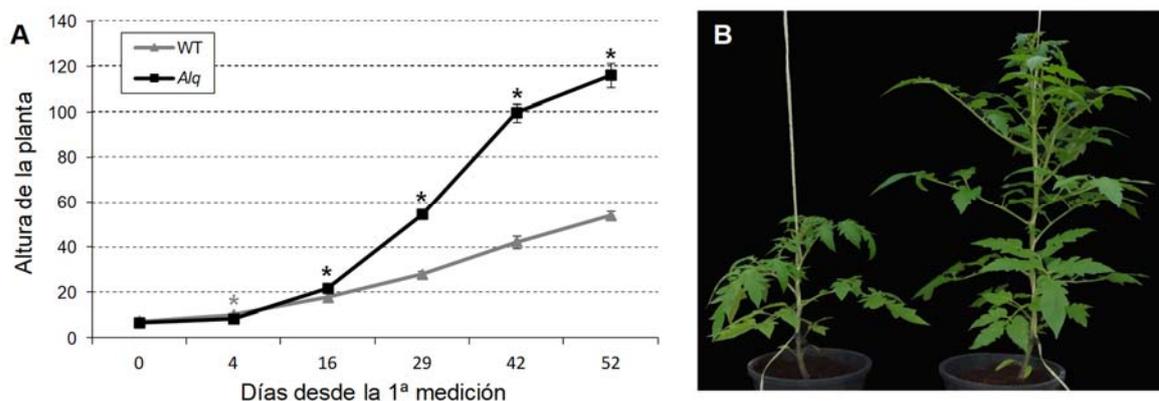


Figura 41. A) Altura de plantas WT y *Alq* a lo largo del tiempo. B) Detalle de la altura de una planta WT (izda.) y *Alq* (dcha.) a los 29 días de la primera medición.

Para cada intervalo, * sobre la barra de error indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

In vitro, las plantas se cultivaron en unos recipientes especiales que permitían observar tanto el crecimiento de la parte aérea de la planta como el desarrollo radicular. Tras 50 días de cultivo se vio que las plantas *Alq* eran significativamente más altas que las WT y habían desarrollado más hojas. Además, vimos que, a diferencia de lo que ocurría en el WT, las plantas *Alq* habían desarrollado un elevado número de raíces en el hipocotilo y en el epicotilo (tabla 9, figura 42).

Tabla 9. Altura de las plantas, número de hojas y número de raíces aéreas en el hipocotilo y epicotilo de plantas *Alq* y WT.

Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Genotipo	Altura de las plantas (cm)	Número de hojas	Raíces aéreas	
			Hipocotilo	Epicotilo
WT	16,23 ± 1,40 ^b	2,33 ± 0,33 ^a	1,00 ± 0,58 ^a	0,33 ± 0,33 ^a
<i>Alq</i>	23,50 ± 0,96 ^a	4,00 ± 0,58 ^a	10,00 ± 1,53 ^a	12,33 ± 8,09 ^a



Figura 42. Plantas WT y *Alq* tras 50 días de cultivo *in vitro*. Las flechas indican la región de los cotiledones (Cot.). La barra representa 1 cm.

También observamos que la longitud de los hipocotilos era diferente en las plantas *Alq* y WT. Como se puede ver en la tabla 10, la longitud del hipocotilo de las plantas WT era significativamente mayor que el de las plantas *Alq*. En cambio, a lo largo del periodo de cultivo *in vitro*, el epicotilo de las plantas *Alq* había crecido significativamente más que el de las plantas WT (tabla 10, figura 42).

Tabla 10. Longitud del hipocotilo y epicotilo de plantas *Alq* y WT. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Genotipo	Longitud hipocotilo (cm)	Longitud epicotilo (cm)
WT	11,17 \pm 0,60 ^a	5,07 \pm 0,99 ^b
<i>Alq</i>	7,93 \pm 0,07 ^b	15,57 \pm 0,98 ^a

El mayor vigor de las plantas *Alq* podría deberse a un cambio en la arquitectura radicular. Por ello, otro de los parámetros que quisimos controlar durante el cultivo de las plantas fue el desarrollo de raíces laterales a lo largo del tiempo. Se contabilizó el número de raíces laterales que desarrollaron las plantas WT y *Alq* a los 6, 14, 30 y 37 días de la germinación. Aunque en general las plántulas WT habían desarrollado más raíces laterales, pudimos comprobar que en estas condiciones las diferencias no resultaban significativas (figura 43A).

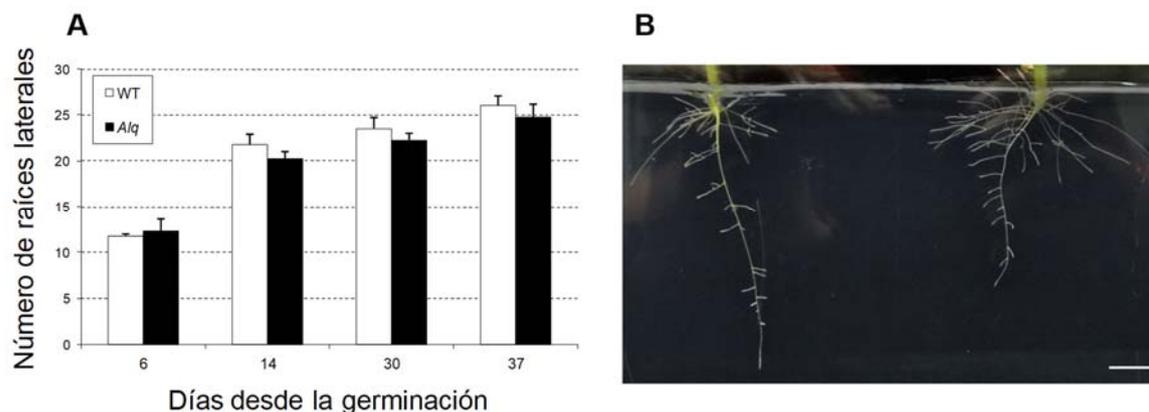


Figura 43. A) Número de raíces laterales que desarrollaron las plantas WT y *Alq* a los 6, 14, 30 y 37 días de la germinación. B) Raíz de una planta WT (izda.) y de una planta *Alq* (dcha.) a los 14 días de la germinación. La barra representa 1 cm.

Para cada intervalo, * sobre la barra de error indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Por otro lado, en el experimento apreciamos que la raíz principal de las plantas *Alq* era un poco más corta mientras que las raíces laterales parecían más largas, principalmente las más próximas a la base del hipocotilo (figura 43B). Decidimos realizar un nuevo experimento con el objetivo de evaluar estos parámetros que nos habían llamado la atención. En concreto, evaluamos de nuevo la longitud del hipocotilo, y por lo que respecta a las raíces, evaluamos el número de raíces laterales, la longitud de la raíz principal y la longitud de las tres raíces laterales más próximas a la base del hipocotilo. Estos parámetros se evaluaron en plántulas tanto de 7 como de 25 días.

Al igual que habíamos visto en el anterior experimento, los hipocotilos de las plantas WT tenían significativamente más longitud que los de las plantas *Alq*, tanto a los 7 como a los 25 días (tabla 11, figura 44). De hecho, la longitud del hipocotilo de plantas *Alq* no incrementó significativamente entre los 7 y los 25 días, mientras que en el caso de las plantas WT este valor aumentó significativamente. Por lo que respecta a las raíces, vimos que la raíz principal de las plantas WT era significativamente más larga en plantas de 7 días, pero en plantas de 25 días no existían diferencias significativas (tabla 11). Respecto a la longitud de las raíces laterales, las plántulas WT tenían significativamente más longitud a los 7 días (figura 44A). Sin embargo, a los 25 días, las raíces laterales de las plantas *Alq* habían crecido en longitud significativamente más que las del WT a excepción de la más próxima al hipocotilo, cuya longitud no difería significativamente respecto a la del WT (tabla 11, figura 44B).

Tabla 11. Longitud del hipocotilo, longitud de la raíz principal, número de raíces laterales, longitud de la 1ª, 2ª y 3ª raíz lateral más próxima al hipocotilo y número de raíces laterales que tienen una longitud de 3 o más cm en plantas WT y *Alq* de 7 y 25 días cultivadas *in vitro*.

Para cada edad de la plántula, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher). Se muestran en negrita los resultados con diferencias significativas.

Edad de la plántula		7 días		25 días	
Genotipo		WT	<i>Alq</i>	WT	<i>Alq</i>
Longitud hipocotilo		4,73 ± 0,09 ^a	3,20 ± 0,12 ^b	5,27 ± 0,14 ^a	3,46 ± 0,11 ^b
Longitud raíz principal		5,10 ± 0,08 ^a	4,57 ± 0,09 ^b	5,15 ± 0,12 ^a	4,86 ± 0,13 ^a
Nº de raíces laterales		11,20 ± 0,63 ^a	9,10 ± 0,75 ^b	22,30 ± 0,88 ^a	17,00 ± 0,70 ^b
Longitud raíces laterales (cm)	1ª raíz	1,08 ± 0,09 ^a	0,72 ± 0,10 ^b	3,21 ± 0,19 ^a	3,55 ± 0,16 ^a
	2ª raíz	1,00 ± 0,13 ^a	0,54 ± 0,08 ^b	2,36 ± 0,22 ^b	3,27 ± 0,11 ^a
	3ª raíz	0,96 ± 0,10 ^a	0,50 ± 0,07 ^b	1,73 ± 0,20 ^b	3,00 ± 0,12 ^a
Nº raíces laterales ≥ 3 cm		0	0	0,70 ± 0,21 ^b	3,00 ± 0,71 ^a

Además, en plantas de 25 días contabilizamos el número de raíces laterales de una longitud igual o mayor a 3 centímetros. Vimos que en promedio las plantas *Alq* tenían 3 raíces laterales de 3 o más centímetros, mientras que sólo algunas plantas WT tenían alguna raíz de esa longitud (tabla 11).

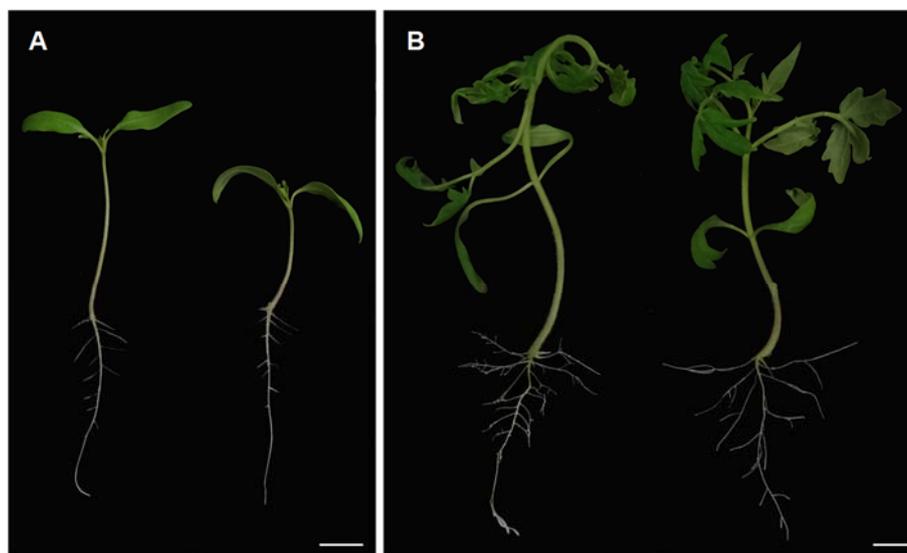


Figura 44. A) Plántulas WT (izda.) y *Alq* (dcha.) de 7 días. B) Plántulas WT (izda.) y *Alq* (dcha.) de 25 días. La barra representa 1 cm.

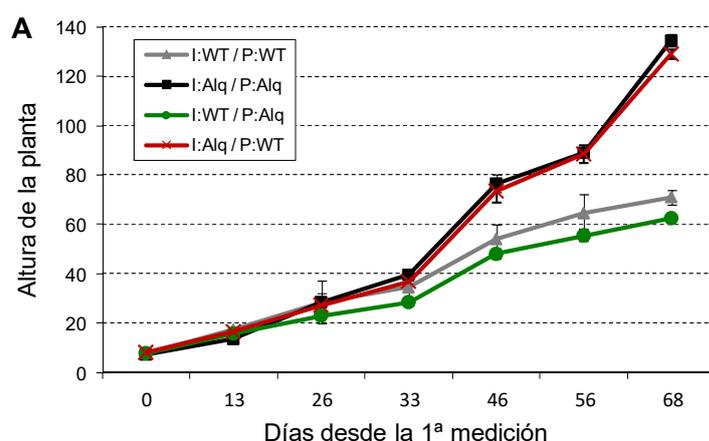
Los resultados parecen indicar que la expresión ectópica de *ALQ* no solo altera el patrón de crecimiento vegetativo, sino también la arquitectura radicular del mutante.

Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos realizar dos experimentos adicionales. Por un lado, nos planteamos la hipótesis de que la mayor longitud de las raíces laterales podría ser responsable del porte más vigoroso de la planta. Para validar esta hipótesis realizamos injertos en todos los sentidos entre plantas WT y *Alq*.

Por otro lado, si las plantas *Alq* eran más vigorosas y tenían un mayor desarrollo de las raíces laterales quizás tolerarían mejor situaciones de estrés. Para comprobarlo, se realizó un experimento *in vitro* en el que comparamos el desarrollo de plantas WT y *Alq* en condiciones estándar de crecimiento y en medio suplementado con manitol, para tratar de simular, mediante estrés osmótico, una situación de estrés hídrico.

Por lo que respecta al ensayo de injertos, se realizaron las 4 combinaciones posibles, es decir, injertamos la parte aérea del WT y de *Alq* sobre un patrón WT e hicimos lo mismo empleando un patrón *Alq*. La medición de la altura de las plantas se inició a partir del momento en el que observamos que el injerto había sellado. Seleccionamos plantas de similar altura (en torno a 8 cm) y evaluamos la altura de las plantas a los 13, 26, 33, 46, 56 y 68 días. A los 13 días de la primera evaluación, las plantas *Alq* injertadas sobre su propio patrón (i.e. *Alq*) tenían significativamente menos altura que el resto de los injertos, entre los que no se detectaron diferencias significativas (figura 45). A los 26 y 33 días no se detectaron diferencias significativas de altura entre los 4 tipos de injertos. Sin embargo, a partir de los 46 días vimos que las plantas que portaban la parte aérea de *Alq* eran significativamente más altas que las que portaban la parte aérea WT, independientemente del patrón sobre el que estuviesen injertadas. Además, entre plantas con parte aérea *Alq*, independientemente del patrón (i.e. WT o *Alq*), no se detectaron diferencias significativas, y lo mismo ocurrió con las WT (figura 45). Por ejemplo, en la última evaluación, las plantas *Alq* injertadas sobre patrón *Alq* tenían una altura promedio de 134,5 cm y la altura de las injertadas sobre patrón WT era de 129 cm. Entre ellas no existían diferencias significativas. Respecto a las plantas WT, las injertadas sobre patrón WT tenían una altura promedio de 71 cm y las injertadas sobre patrón *Alq* eran, en promedio, de 62,5 cm. Entre estas tampoco existían diferencias significativas. En cualquier

caso, los datos parecían reflejar ligeras diferencias en función del patrón empleado y, en este sentido, vimos que, en general, cada línea crecía ligeramente mejor sobre su propio patrón. Los resultados obtenidos en el experimento con los injertos indican que el mayor vigor de *Alq* viene determinado por la arquitectura de la parte aérea y no por el desarrollo distintivo de su sistema radicular. Por tanto, aunque el mayor desarrollo en longitud de las raíces laterales podría proporcionar ventajas en determinadas condiciones de cultivo, no es la causa determinante de la mayor altura de las plantas mutantes.



Injertos	Días desde la primera medición (nivel de significación)						
	0	13	26	33	46	56	68
I:WT / P:WT	a	a	a	a	b	b	b
I:Alq / P:Alq	a	b	a	a	a	a	a
I:WT / P:Alq	a	a	a	a	b	b	b
I:Alq / P:WT	a	a	a	a	a	a	a

Figura 45. A) Altura de los injertos a lo largo del tiempo. B) Nivel de significación estadística. Para cada medición, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Nota: I: Injerto / P: patrón (i.e. I:WT / P:WT sería un injerto WT sobre un patrón WT).

Como se comentaba anteriormente, también se realizó un experimento *in vitro* para comparar el desarrollo de plantas WT y *Alq* en condiciones estándar de crecimiento y en medio suplementado con manitol. Para realizar el experimento se utilizó otro tipo de recipientes (tubos de vidrio de 24 cm de altura y 4 cm de diámetro) que permiten que las plantas alcancen una altura considerable. En condiciones estándar de crecimiento (i.e. sin estrés), las plantas se mantuvieron en cultivo durante un periodo de 30 días, mientras que en condiciones de estrés (medio de cultivo suplementado con manitol) estuvieron durante un periodo más

prolongado (i.e. 60 días). Evaluamos la longitud del tallo, la longitud del cepellón radicular y el número de hojas.

En ausencia de estrés, las plantas WT crecieron más que las plantas *Alq*. Como se puede ver en la tabla 12 y en la figura 46, tanto la longitud del tallo como la longitud del cepellón radicular y el número de hojas fueron significativamente mayores en el WT.

Tabla 12. Longitud del tallo, longitud de las raíces y número de hojas en plantas WT y *Alq* cultivadas en medio sin manitol y con 100 mM de manitol.

Para cada condición, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Parámetros	0 mM de manitol		100 mM de manitol	
	WT	<i>Alq</i>	WT	<i>Alq</i>
Longitud del tallo	20,83 ± 0,83 ^a	17,25 ± 1,09 ^b	12,50 ± 0,29 ^b	17,50 ± 0,29 ^a
Longitud de la raíces	8,00 ± 0,10 ^a	5,08 ± 0,34 ^b	5,80 ± 0,54 ^b	12,00 ± 0,58 ^a
Número de hojas	5,83 ± 0,37 ^a	4,92 ± 0,33 ^b	2,90 ± 0,40 ^b	9,17 ± 0,17 ^a

Notas: las plantas se cultivaron durante 30 días en el medio sin manitol y durante 60 días en el medio suplementado con 100 mM de manitol.

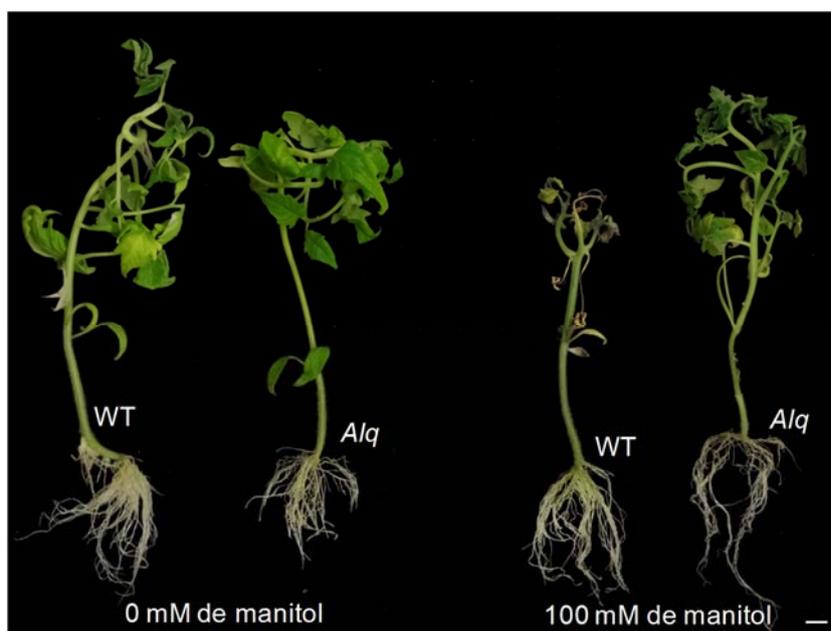


Figura 46. Plantas WT y *Alq* cultivadas en medio sin manitol (30 días) y en medio suplementado con 100 mM de manitol (60 días).

La barra representa 1 cm.

En el medio suplementado con 100 mM de manitol ocurría lo contrario, y las plantas *Alq* crecieron más en altura y desarrollaron más hojas (tabla 12). Con relación a estos dos parámetros conviene indicar que las plantas WT exhibían graves síntomas de marchitamiento vegetativo (figura 46). Aunque no de forma

tan severa, estos síntomas ya eran visibles en las plantas WT a los 30 días de cultivo, pero no en las plantas *Alq*. Por esa razón quisimos prolongar el experimento hasta los 60 días, es decir, queríamos ver si este mismo fenómeno también aparecía en las plantas *Alq* a más largo plazo. Lo que pudimos observar tras los 60 días de cultivo en medio con manitol fue que las plantas *Alq* seguían creciendo y las WT estaban prácticamente muertas (figura 46). Además, la longitud del cepellón radicular era mucho mayor en las plantas *Alq*, aunque las plantas WT parecían tener más densidad radicular (figura 46). Separando con cuidado las raíces pudimos observar que la longitud del cepellón radicular de las plantas *Alq* se debía principalmente a la mayor longitud de las raíces laterales, mientras que la mayor densidad de las raíces WT era consecuencia del desarrollo de raíces laterales de mayor grosor pero de una considerable menor longitud (figuras 47A y 47B).

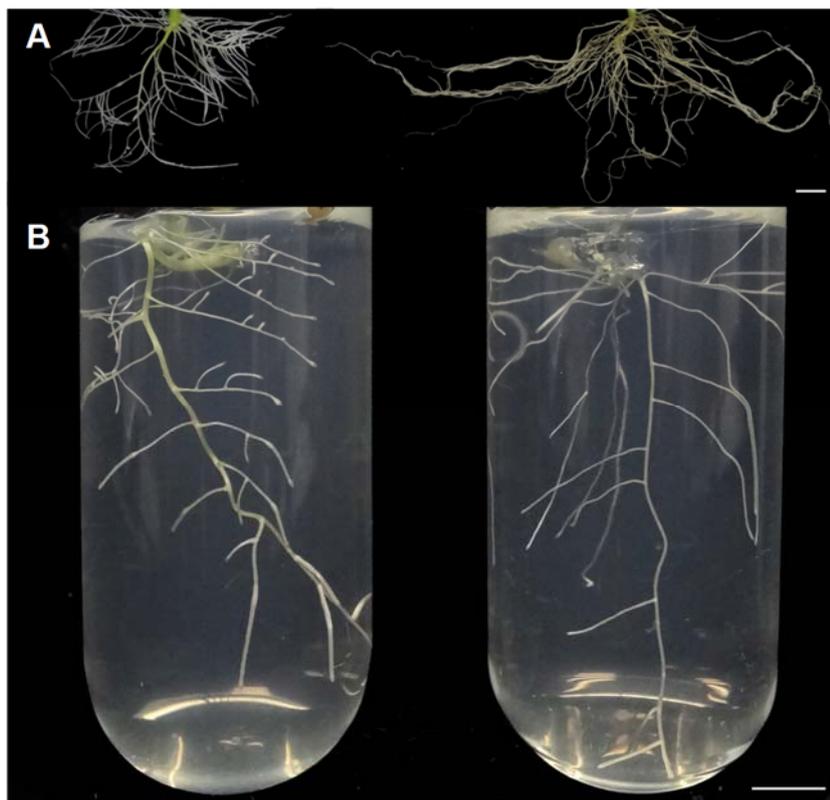


Figura 47. Raíces de plantas WT (izda.) y *Alq* (dcha.) cultivadas en medio con manitol A) Raíces del WT y *Alq* a la conclusión del experimento. B) Raíces del WT y *Alq* tras 40 días de cultivo en medio con manitol. En ambas figuras se aprecia la mayor longitud de las raíces laterales del mutante *Alq* y el mayor grosor pero menor longitud de las raíces laterales del WT.

La barra representa 1 cm.

Los resultados parecen indicar que *Alq* es capaz de tolerar mejor ciertas condiciones de estrés *in vitro*. Es posible, por tanto, que el mayor vigor vegetativo y una arquitectura radicular más favorable determinen un mejor comportamiento del mutante en ciertas condiciones de estrés abiótico.

4.3.2. Evaluación de la tasa de cuajado del mutante *Alq*

Los cambios fenotípicos que promueve la mutación *Alq* sugieren que la expresión ectópica de este gen podría alterar la tasa de cuajado. En efecto, los sépalos del mutante son capaces de cuajar en fruto en ausencia de polinización, adquirir características de sumidero y madurar como un fruto verdadero. Además, los patrones espaciales y temporales de expresión de *ALQ* indican que este gen debe desempeñar un papel importante en el proceso de cuajado ya que, a lo largo del desarrollo floral, los mayores niveles de transcrito se detectan en el estadio de anthesis, es decir, en el estadio en el que se produce la polinización. Por otro lado, en las diferentes cosechas que se habían ido realizando a lo largo de los últimos años se había visto que las plantas *Alq* producían más frutos que las WT. Por ello, realizamos una evaluación de diferentes parámetros relacionados con la producción de fruto para ver si la tasa de cuajado y la producción eran realmente mayores en el mutante *Alq*.

Como se comentaba al inicio de este capítulo, la conversión de los sépalos en frutos ocurre con independencia de que se produzca o no el cuajado de fruto verdadero y, además, el desarrollo y maduración de los frutos que proceden del cáliz y del ovario se produce de forma asincrónica. Para conocer la contribución de cada órgano en la producción por planta, contabilizamos y pesamos por separado los frutos derivados del ovario y los derivados del cáliz floral en las primeras 7 inflorescencias de las plantas. Como se puede ver en la tabla 13, el cuajado de fruto verdadero (i.e. fruto derivado del ovario) fue significativamente mayor en *Alq*. En este sentido, el cuajado de fruto a partir del ovario ocurría en más del 90% de las flores *Alq* y tan sólo en el 40% de las flores WT. La mayor tasa de cuajado del mutante *Alq* era consecuencia del desarrollo de un mayor número de frutos por inflorescencia, ya que el número de flores por inflorescencia fue similar en ambas líneas (tabla 13). Por otro lado, más del 95% de las flores *Alq* desarrollaban frutos a partir del cáliz, un evento que nunca se observó en las flores WT (tabla 13).

Tabla 13. Caracterización del desarrollo reproductivo en plantas WT y *Alq*.

Los valores se expresan como la media \pm error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Parámetros		WT	<i>Alq</i>
Flores por inflorescencia		9,90 \pm 0,95 (a)	10,06 \pm 0,39 (a)
Frutos derivados del ovario	Frutos por inflorescencia	4,23 \pm 0,65 (b)	9,23 \pm 0,40 (a)
	Tasa de cuajado (%)	42,73 \pm 5,10 (b)	93,11 \pm 1,41 (a)
	Peso del fruto (g)	22,75 \pm 1,32 (a)	14,16 \pm 0,34 (b)
	Producción por planta (g)	672,68 \pm 68,98 (b)	869,65 \pm 27,70 (a)
Frutos derivados del cáliz	Frutos por inflorescencia	n.d.	9,80 \pm 0,43
	Tasa de cuajado (%)	n.d.	97,74 \pm 0,84
	Peso del fruto (g)	n.d.	5,43 \pm 0,10
	Producción por planta (g)	n.d.	340,81 \pm 13,89
Frutos derivadas de ovario y caliz	Frutos por inflorescencia	4,23 \pm 0,65 (b)	9,80 \pm 0,43 (a)
	Tasa de cuajado (%)	42,73 \pm 5,10 (b)	97,74 \pm 0,84 (a)
	Peso del fruto (g)	22,75 \pm 1,32 (a)	19,60 \pm 0,40 (a)
	Producción por planta (g)	672,68 \pm 68,98 (b)	1210,65 \pm 27,70 (a)

Como era de esperar, el mayor número de frutos cuajados en *Alq* y la competencia que se establece entre los dos sumideros (i.e. frutos derivados del ovario y del cáliz) afectaron al calibre del fruto verdadero. Así, el peso medio de los frutos verdaderos del mutante *Alq* era menor que el de las plantas WT (tabla 13). A pesar de ello, la producción por planta fue significativamente mayor en el mutante *Alq*. Teniendo en cuenta sólo los frutos derivados del ovario, la producción por planta de *Alq* era un 30% mayor que la del WT (869 g respecto a 672 g, tabla 13), mientras que si también se tenían en cuenta los frutos derivados del cáliz, la producción por planta de *Alq* aumentaba a un 80% respecto a la del WT.

4.3.3. El mutante *Alq* exhibe partenocarpia facultativa

Previo al inicio de este trabajo de investigación se había visto que los frutos de *Alq* contenían muy poca semilla. De media, en cada cosecha se recolectaban en torno a 1150 semillas a partir de cada planta WT, mientras que de *Alq* no se conseguían más de 200 (comunicación personal del Dr. Pineda). También se había observado que, aunque en general los frutos *Alq* siempre eran de menor

tamaño, algunos de los frutos que se desarrollaban en las plantas *Alq* eran de tamaño similar, e incluso mayor, que los del WT.

Para clarificar la razón por la cual los frutos *Alq* contenían menos semilla determinamos la proporción de frutos con y sin semilla en el WT y *Alq*. Además, contabilizamos el número de semillas en los frutos de mayor calibre. Pudimos comprobar que la mayor parte de los frutos *Alq* carecían de semilla mientras que esto sólo ocurría en una pequeña proporción de los frutos WT (tabla 14).

Tabla 14. Porcentaje y peso medio de los frutos sin semilla en el WT y *Alq*.

Los valores se expresan como la media \pm error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Línea	Número de frutos evaluados	Frutos sin semilla (%)	Peso de los frutos (g)
WT	118	2,95 \pm 1,35 (b)	6,34 \pm 0,45 (b)
<i>Alq</i>	220	72,78 \pm 4,52 (a)	12,56 \pm 1,66 (a)

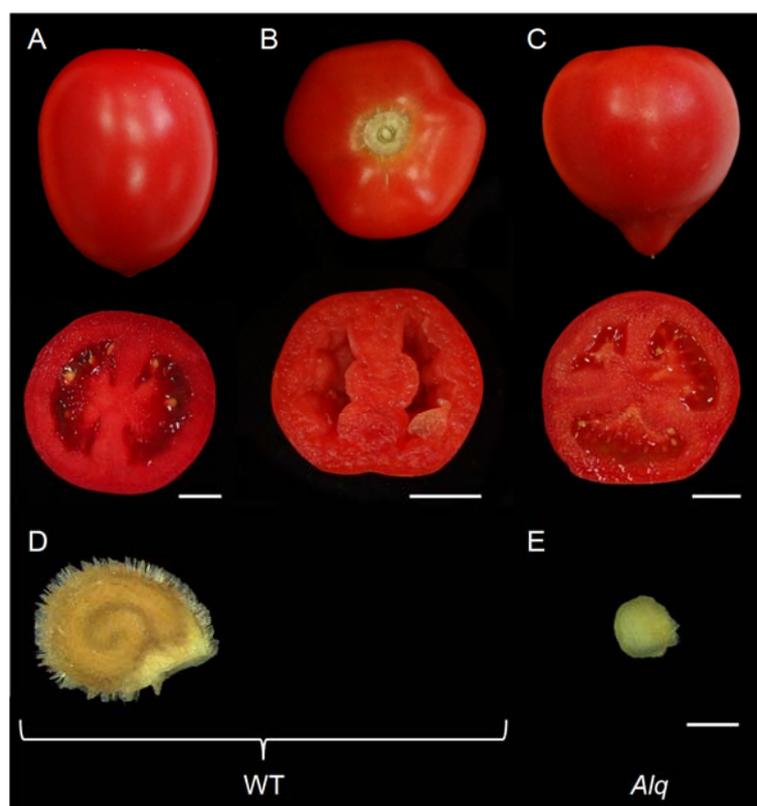


Figura 48. Frutos de plantas WT y *Alq*. A) Fruto con semilla de una planta WT. B) Fruto sin semilla de una planta WT. C) Fruto sin semilla de una planta *Alq*. D) Detalle de una de las semillas de un fruto WT. E) Detalle de uno de los rudimentos seminales de un fruto *Alq*.

Escala de barras: 1 cm en A, B y C, 1 mm en D y E.

Respecto a los frutos sin semilla, los de las plantas *Alq* eran de un calibre significativamente mayor que los del WT. Además, los lóculos de los frutos WT no contenían mucílago y tenían una morfología irregular ('falsos frutos' o 'frutos tipo nuez'), mientras que los de *Alq*, a pesar de su pequeño calibre, eran de morfología más uniforme, sus lóculos estaban llenos de mucílago y, lo que resulta más notable, contenían rudimentos seminales (figura 48).

Por otro lado, vimos que sólo los frutos de mayor calibre de las plantas *Alq* contenían un número suficiente de semilla (i.e. > 15 semillas). Como se puede ver en la tabla 15, el número de semillas en frutos de unos 60 g de peso era similar en el WT y en *Alq*.

Estos resultados sugieren que la mayor parte de los frutos *Alq* cuajan en ausencia de polinización y, en parte, eso podría explicar que no alcancen el peso medio de los frutos WT. Sin embargo, cuando se produce la polinización y fecundación de los óvulos, los frutos *Alq* son capaces de alcanzar el calibre del fruto WT.

Tabla 15. Número de semillas por fruto y peso medio de frutos con semilla del WT y *Alq*. Los valores se expresan como la media \pm error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Línea	Nº de frutos con semilla evaluados	Nº de semillas / fruto	Peso medio de los frutos evaluados (g)
WT	25	33,56 \pm 3,49 (a)	59,36 \pm 2,09 (a)
<i>Alq</i>	22	30,12 \pm 5,41 (a)	60,71 \pm 4,18 (a)

La menor viabilidad del polen podría ser una de las razones de la partenocarpia de los frutos *Alq*. Para comprobarlo, analizamos la viabilidad del polen en flores en antesis de plantas WT y *Alq* mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

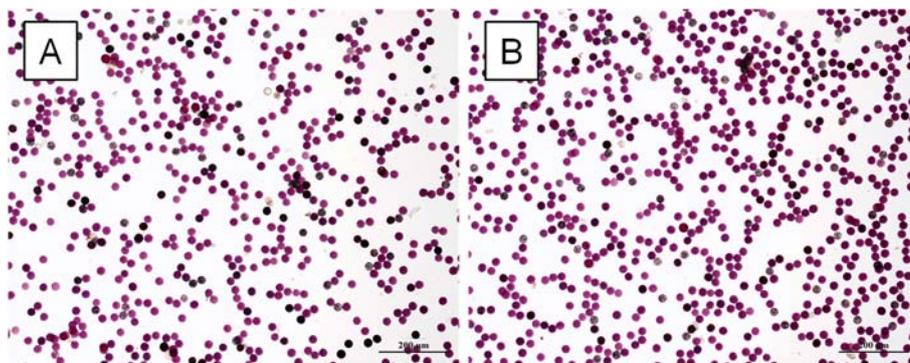


Figura 49. Ensayo *in vitro* de viabilidad del polen en el WT (A) y *Alq* (B).

Los resultados del análisis *in vitro* indicaron que la viabilidad del polen *Alq* no se encontraba afectada ya que los granos de polen de sus flores exhibían el mismo tamaño, morfología y tinción que los de las flores WT (figura 49).

Tabla 16. Peso medio del fruto y número medio de semillas por fruto en retrocruces recíprocos entre el WT y *Alq*.

Los valores se expresan como la media \pm error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Retrocruce	Número de frutos evaluados	Peso del fruto (g)	Nº semillas / fruto
<i>Alq</i> x WT	12	47,21 \pm 3,37 (a)	39,42 \pm 5,83 (a)
WT x <i>Alq</i>	15	52,15 \pm 5,18 (a)	40,25 \pm 4,95 (a)

El análisis *in vivo* se llevó a cabo mediante retrocruces recíprocos entre el WT y *Alq*. En ambos retrocruces se obtuvieron frutos de tamaño parecido y con un número medio de semillas similar (tabla 16). Los resultados indicaban, por tanto, que el desarrollo de frutos sin semilla en las plantas *Alq* no estaba relacionado con menor viabilidad del polen. Estos resultados mostraban, además, que los óvulos de *Alq* eran completamente viables.

4.3.4. Los ovarios del mutante *Alq* experimentan cuajado prematuro

En el desarrollo normal de un fruto, el inicio del cuajado depende del éxito de la polinización y fecundación (Gillaspy et al, 1993), siendo la antesis floral el estadio en el que ocurren estos procesos. Pocos días antes de la antesis, el ovario entra en un estado de interrupción del crecimiento (se detienen las divisiones celulares), y cuando se completa con éxito el proceso de fertilización, el ovario reanuda de nuevo el crecimiento.

Con el objetivo de evaluar un posible cuajado prematuro del fruto examinamos el diámetro de ovarios WT y *Alq* en tres estadios del desarrollo floral: 5 días previos a la antesis, 2 días previos a la antesis y estadio de antesis. En ovarios en estadios de 5 y 2 días previos a la antesis no observamos diferencias significativas de diámetro entre el WT y *Alq*, aunque los ovarios *Alq* en el estadio de 2 días previos a la antesis tenían un diámetro ligeramente mayor (figura 50). En estadio de antesis, el diámetro de los ovarios *Alq* era significativamente mayor que el de los ovarios WT (figura 50). En concreto, el diámetro medio de los ovarios WT fue de 2,01 mm mientras que el de los ovarios *Alq* era de 2,37 mm, lo que representa aproximadamente un 17% de incremento.

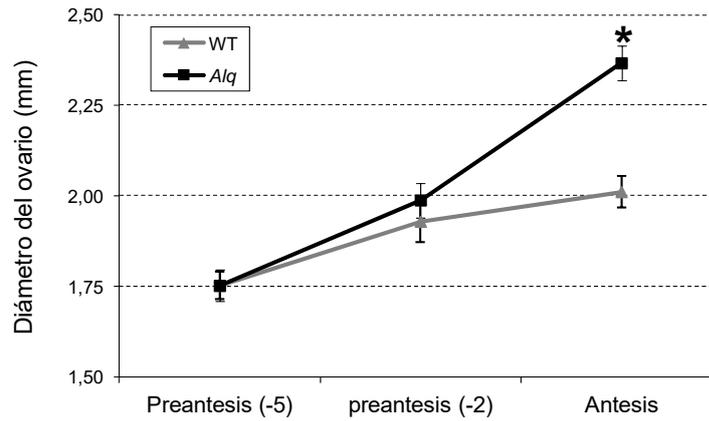


Figura 50. Comparación del desarrollo del ovario en el WT y *Alq* en los estadios del desarrollo floral de 5 días previos a la antesis (pre-antesis -5), 2 días previos a la antesis (pre-antesis -2) y estadio de antesis.

Los valores se expresan como la media \pm error estándar. * sobre la barra de error indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Para obtener más información acerca del aumento de diámetro de los ovarios *Alq* analizamos mediante histología secciones transversales de ovarios en estadio de antesis. Observamos que el espesor del pericarpio de los ovarios *Alq* era significativamente mayor que el de los ovarios WT (tabla 17, figura 51).

Tabla 17. Espesor, número de capas celulares y tamaño de las células del pericarpio de ovarios en estadio de antesis del WT y *Alq*.

Los valores se expresan como la media \pm error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Parámetros	WT	<i>Alq</i>
Espesor del pericarpio (μm)	102,56 \pm 3,28 (b)	184,75 \pm 5,79 (a)
Capas celulares del pericarpio (n)	9,93 \pm 0,15 (b)	14,15 \pm 0,17 (a)
Tamaño de las células del pericarpio (μm)	18,05 \pm 0,29 (a)	18,16 \pm 0,27 (a)

Pudimos comprobar que el mayor espesor del pericarpio se debía a un mayor número de capas celulares ya que el tamaño de las células pericárpicas era similar en las dos líneas (tabla 17). Estos resultados sugieren que el mayor tamaño del ovario *Alq* en el estadio de antesis se debe a procesos prematuros de división celular previos a la fertilización de los óvulos. Es decir, mientras que el ovario del WT se encuentra en un estado de interrupción del crecimiento o bien está a punto de reanudarlo, el ovario *Alq* se encuentra en un proceso de activa división celular. Por tanto, en *Alq* se han iniciado las divisiones celulares en etapas previas a la fertilización de los óvulos.

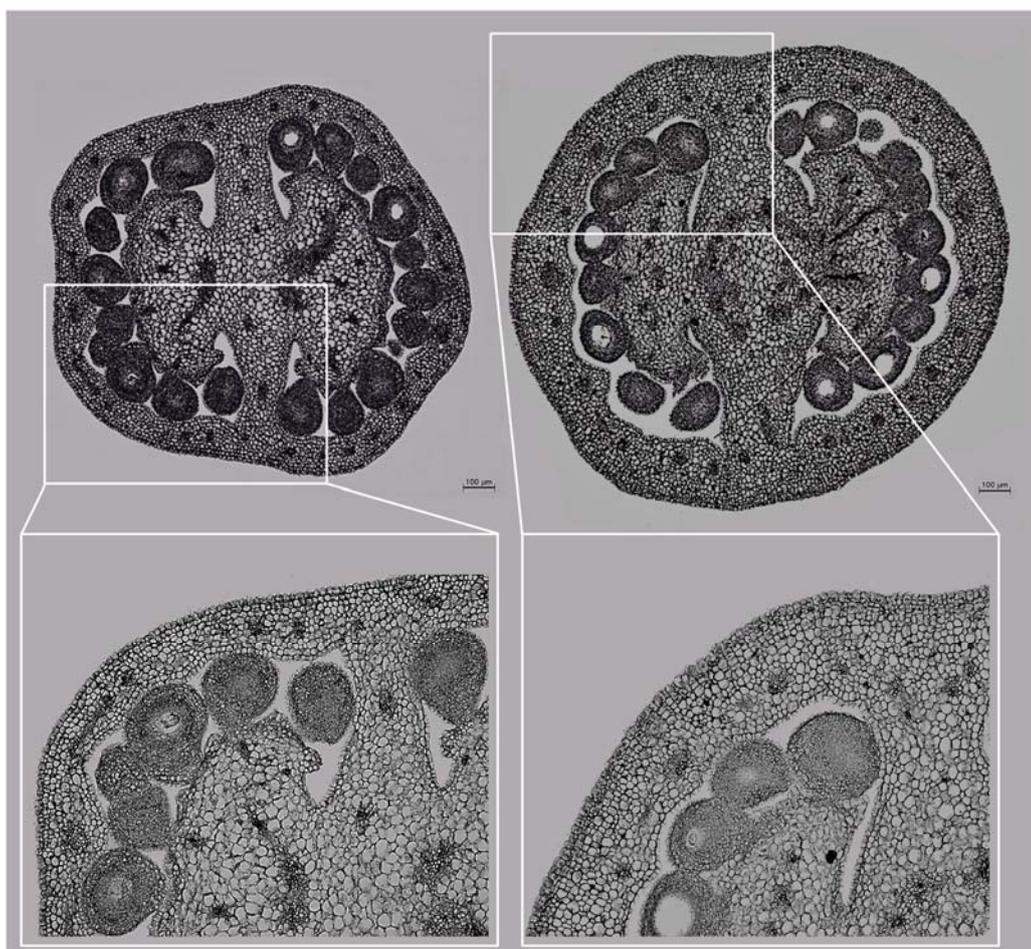


Figura 51. Secciones transversales de ovarios en estadio de antesis del WT (izda.) y de *Alq* (dcha.).

Con el objetivo de determinar si los ovarios *Alq* eran capaces de cuajar en fruto en ausencia de polinización se llevó a cabo un experimento de emasculación floral en estadios previos a la liberación del polen. Como se puede ver en la tabla 18, todas las flores emasculadas de las plantas WT abortaron mientras que el 45% de las flores emasculadas de *Alq* fueron capaces de cuajar frutos (figura 52). Además, se produjo el cuajado de fruto a partir de cáliz *Alq* en casi el 80% de las flores (tabla 18). Estos resultados indican que las flores del mutante *Alq* son capaces de cuajar frutos en ausencia de polinización.

Tabla 18. Cuajado de frutos derivados del ovario y del cáliz a partir de flores WT y *Alq* emasculadas en pre-antesis.

Línea	Nº de flores emasculadas	Nº ovarios cuajados	% de ovarios cuajados	Nº de cáliz cuajados	% de cáliz cuajados
WT	68	0	0	-	-
<i>Alq</i>	69	31	44,9	54	78,3

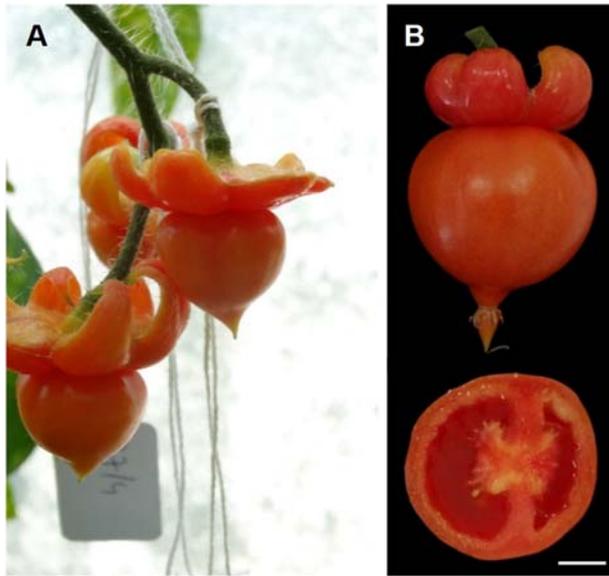


Figura 52. A) Cuajado de un fruto *Alq* a partir de una flor previamente emasculada en preantesis. B) Detalle de un fruto obtenido a partir de una flor emasculada. Se muestra el interior del fruto, con mucílago y rudimentos seminales.

Escala de barras: 1 cm.

4.3.5. Expresión de genes implicados en el cuajado de fruto

Se llevaron a cabo análisis comparativos de expresión para ver las interacciones genéticas entre la mutación *Alq* y otros genes de tomate implicados en el desarrollo reproductivo y el cuajado de fruto. Los análisis se realizaron tanto en cálices como en ovarios de flores en tres estadios del desarrollo floral, a saber, 2 días antes de la antesis (a partir de ahora, pre-antesis), antesis y 5 días posteriores a la antesis (a partir de ahora, post-antesis).

Analizamos si *HYD/SISPL* (Rojas-Gracia et al, 2017), un gen de tomate esencial para el inicio de la esporogénesis y la prevención del crecimiento precoz del ovario, se encontraba afectado en el mutante *Alq*. Los resultados de expresión no revelaron diferencias significativas entre el WT y *Alq*, ni en cálices ni en ovarios (figura 53).

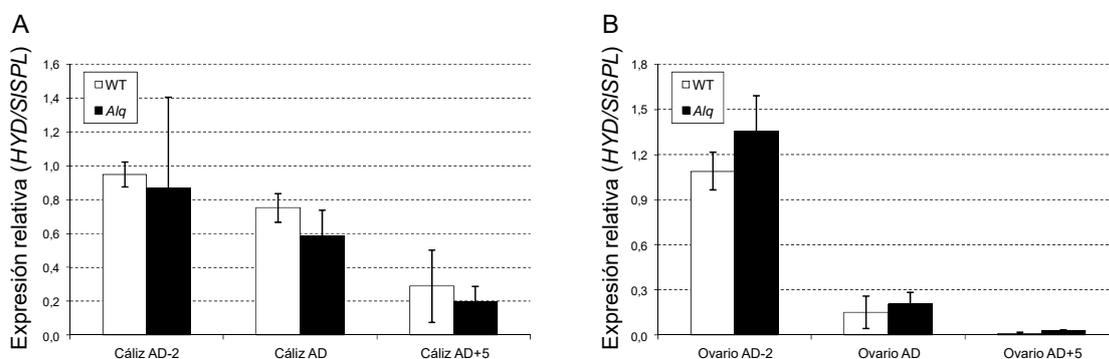


Figura 53. Expresión relativa de *HYD/SISPL* en cálices (A) y ovarios (B) del WT y de *Alq* en estadios de pre-antesis (2 días previos a la antesis), antesis y post-antesis (5 días posteriores a la antesis).

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

También se analizaron los niveles de transcrito de algunos genes implicados en la biosíntesis de las giberelinas (*SIGA20ox1*, *SIGA20ox2*, *SIGA20ox3*, *SIGA3ox1* y *SIGA3ox2*) y en la inactivación de las giberelinas (*SIGA2ox1* y *SIGA2ox2*). En cálices de *Alq* se detectaron cambios importantes en los niveles de transcrito de los genes *SIGA20ox1*, *SIGA20ox2* y *SIGA20ox3*. En este sentido, el gen *SIGA20ox1* exhibía un nivel significativamente mayor de expresión en el estadio de antesis mientras que los genes *SIGA20ox2* y *SIGA20ox3* exhibían una regulación al alza en el estadio de post-antesis (figuras 54A, 54C y 54E). En los ovarios *Alq* no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión del gen *SIGA20ox1* en los estadios de pre-antesis y antesis; sin embargo, su nivel de expresión era significativamente menor en ovarios en post-antesis (figura 54B). Por otro lado, en cálices *Alq* se detectó un mayor nivel de expresión del gen *SIGA3ox1* en los estadios de pre-antesis y post-antesis (figura 55A), mientras que los niveles de transcrito de *SIGA3ox2* fueron menores en antesis y post-antesis (figura 55C). En ovarios *Alq*, los genes *SIGA3ox1* y *SIGA3ox2* se expresaron significativamente más en el estadio de pre-antesis (figuras 55B y 55D). Por lo que respecta a los genes implicados en la inactivación de las giberelinas (*GA2 oxidasas*), no se detectaron cambios en los niveles de transcrito del gen *SIGA2ox1*, ni en cálices ni en ovarios. Sin embargo, el gen *SIGA2ox2* se expresó menos en cálices *Alq* de flores en post-antesis y más en ovarios *Alq* de flores en pre-antesis y antesis (figuras 55G y 55H).

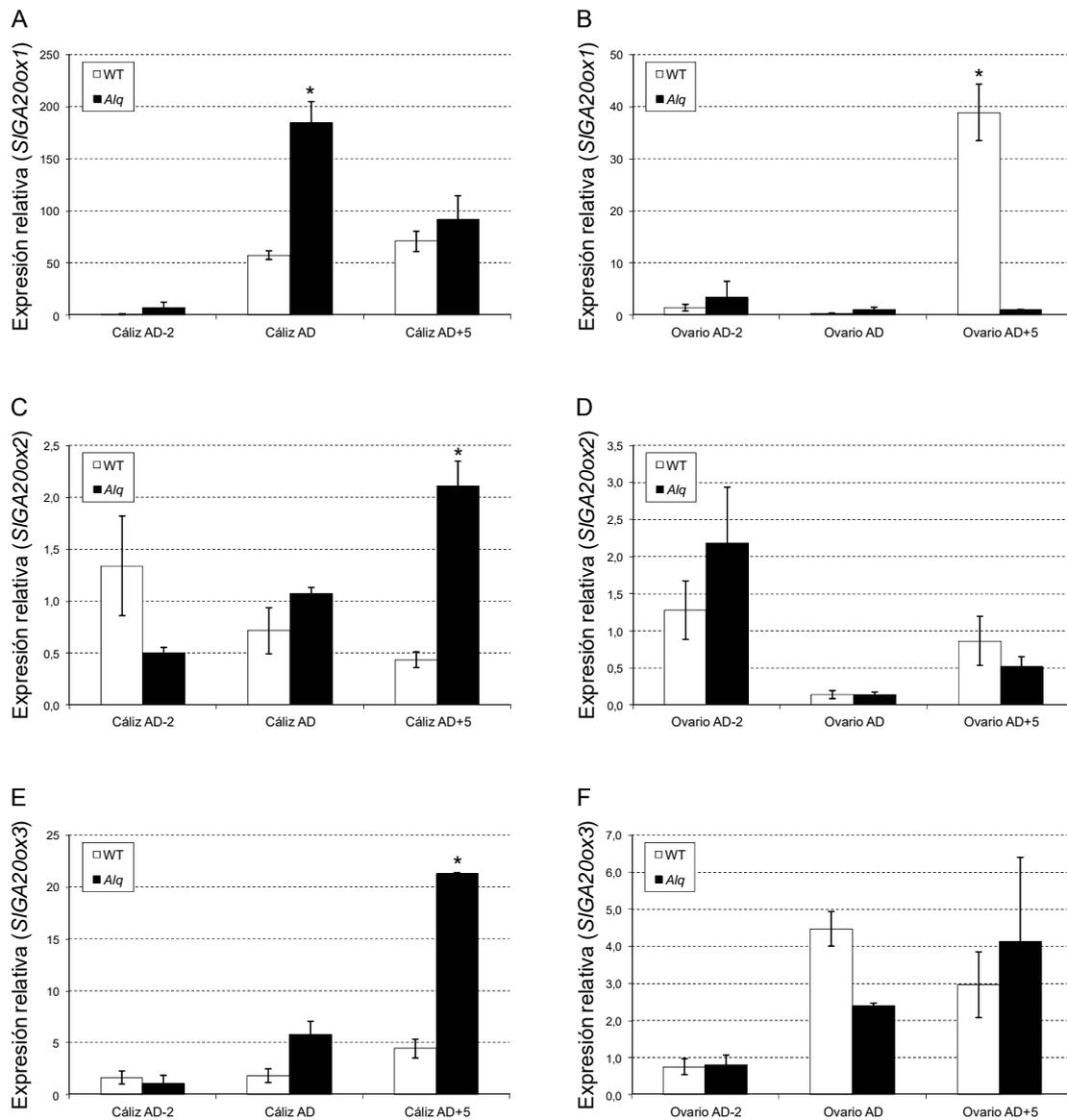


Figura 54. Expresión relativa de los genes *SIGA20ox1*, *SIGA20ox2* y *SIGA20ox3* en cáliz (A, C y E) y ovarios (B, D y F) del WT y de *Alq* en estadios de pre-antesis (2 días previos a la antesis), antesis y post-antesis (5 días posteriores a la antesis).

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

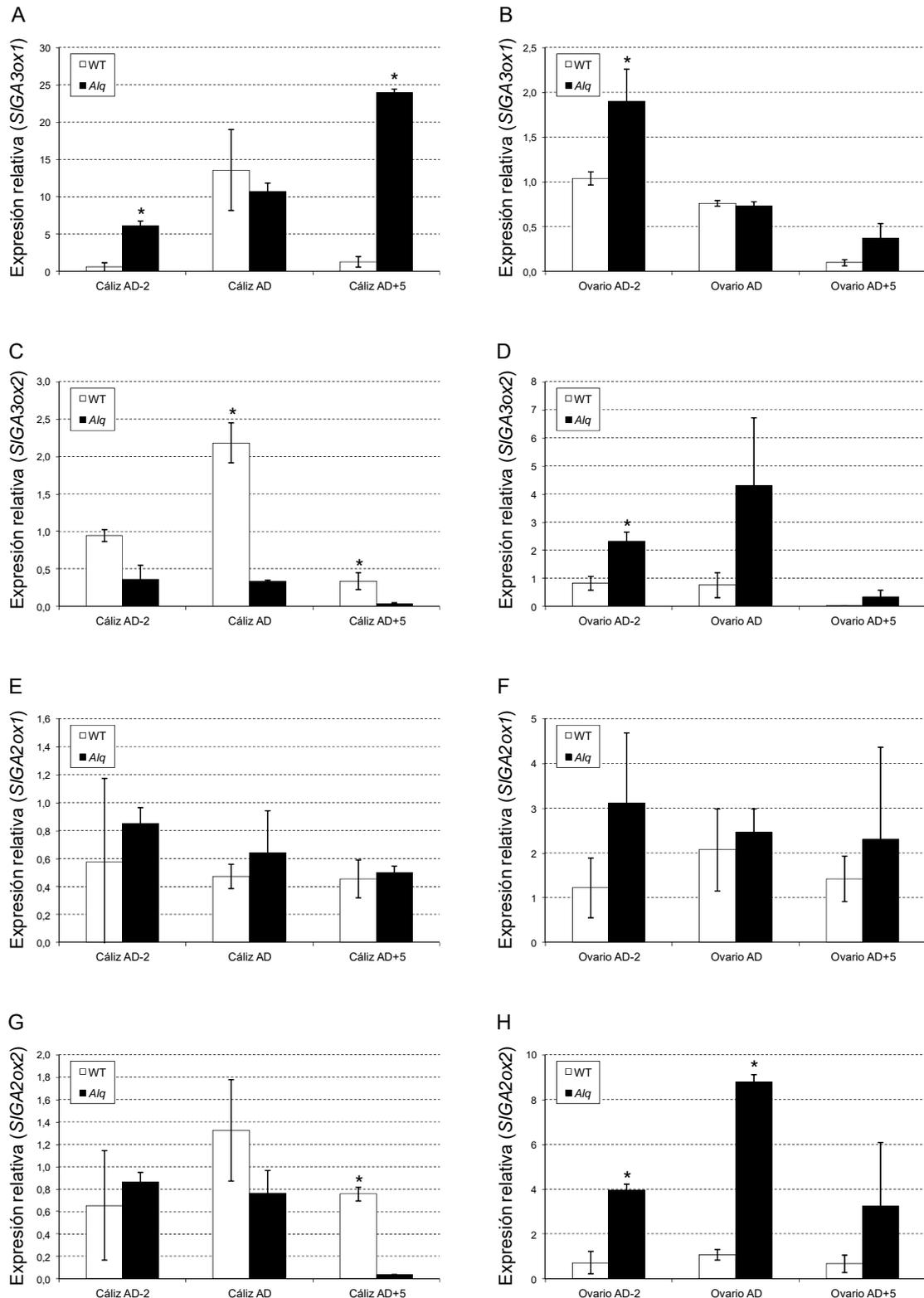


Figura 55. Expresión relativa de los genes *SIGA3ox1*, *SIGA3ox2*, *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2* en cáliz (A, C, E y G) y ovarios (B, D, F y H) del WT y de *Alq* en estadios de pre-antesis (2 días previos a la antesis), antesis y post-antesis (5 días posteriores a la antesis).

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Se analizó la expresión de algunos de los genes de la ruta de señalización de auxina que participan en el control del inicio del desarrollo del fruto (i.e. *SIIAA9*,

SIARF7 y *SIARF8*). Se detectaron mayores niveles de expresión del gen *SIIAA9* en cálices *Alq* de flores en estadio de post-antesis (figura 56A). En ovarios *Alq* no se observaron cambios significativos en la expresión de este gen (figura 56B). El gen *SIARF7* exhibió menor nivel de expresión en cálices *Alq* y mayor en ovarios *Alq* en el estadio de antesis (figuras 56C y 56D). De mayor interés fue lo que ocurrió con la expresión del gen *SIARF8*, que aumentó significativamente en ovarios *Alq* en los estadios de pre-antesis y antesis (figura 56F), mientras que en cálices el nivel de expresión de este gen fue mayor en el estadio de post-antesis (figura 56E).

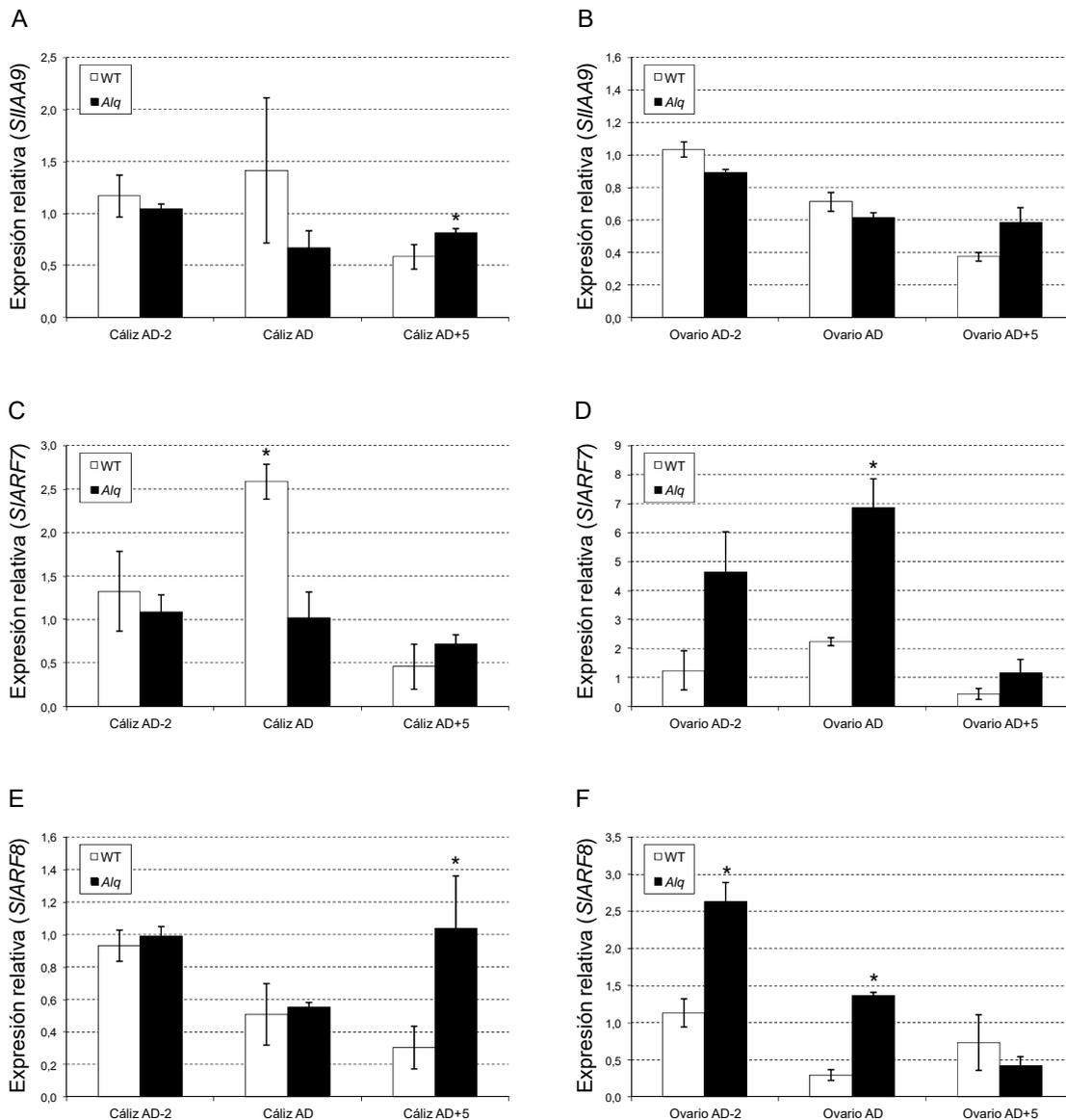


Figura 56. Expresión relativa de los genes *SIIAA9*, *SIARF7* y *SIARF8* en cálices (A, C y E) y ovarios (B, D y F) del WT y de *Alq* en estadios de pre-antesis (2 días previos a la antesis), antesis y post-antesis (5 días posteriores a la antesis).

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Por otro lado, se analizaron los niveles de expresión de tres genes MADS box: *Tomato Agamous 1* (*TAG1*), *Tomato Agamous Like 1* (*TAGL1-ALQ*) y *Tomato Agamous Like 6* (*TAGL6*). Los genes *TAG1* y *TAGL1-ALQ* se encontraban sobre-expresados tanto en los cálices como en los ovarios de las flores *Alq* en la mayor parte de los estadios florales que se evaluaron (figuras 57A-57D).

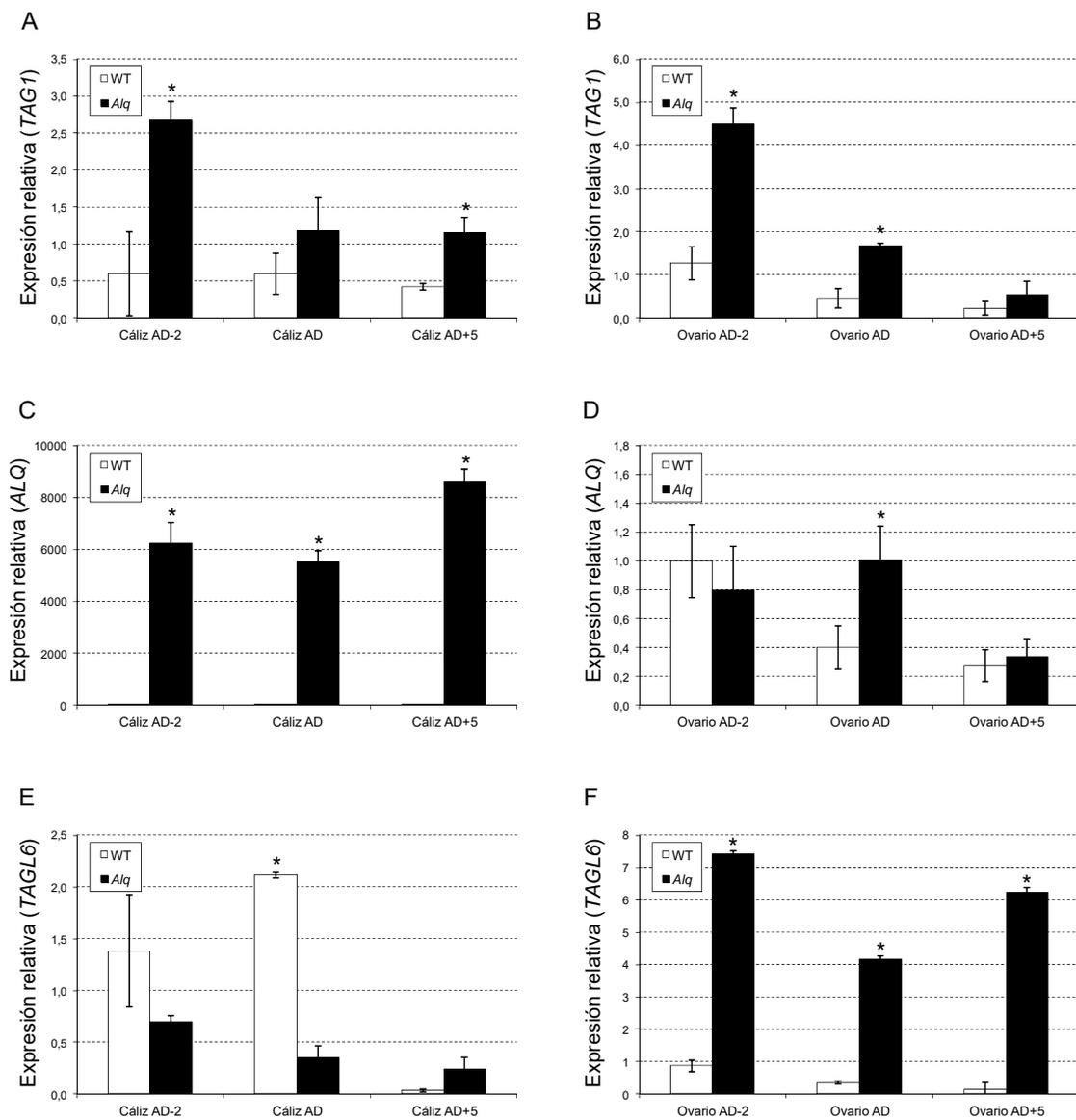


Figura 57. Expresión relativa de los genes *TAG1*, *ALQ-TAGL1* y *TAGL6* en cálices (A, C y E) y ovarios (B, D y F) del WT y de *Alq* en estadios de pre-antesis (2 días previos a la antesis), antesis y post-antesis (5 días posteriores a la antesis).

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Por lo que respecta a *TAG1*, los mayores niveles de transcrito se detectaron en el estadio de pre-antesis (figuras 57A y 57B). En estadios posteriores se detectó una dramática disminución de los niveles de expresión de este gen,

especialmente en ovarios (figura 57B). No se detectó la expresión de *TAGL1-ALQ* en cálices WT, mientras que en cálices *Alq* este gen se encontraba sobre-expresado (figura 57C). En ovarios del mutante sólo detectamos diferencias significativas en la expresión de *TAGL1-ALQ* en el estadio de antesis (figura 57D).

Un sorprendente patrón de expresión se observó tras el análisis del gen *TAGL6* en ovarios de flores *Alq*, donde se detectaron mayores niveles de expresión en todos los estadios del desarrollo que se analizaron (figura 57F). Por el contrario, los niveles de expresión de este gen eran menores en cálices *Alq*, especialmente en el estadio de antesis (figura 57E).

El proceso de cuajado de fruto va acompañado de un incremento en la tasa de división celular. Por ello, también analizamos la expresión de genes que participan en el control de la división (*SIWUS*) y el ciclo celular (*CycA1*, *CycD3* y *CDKA1*). En cálices *Alq* detectamos mayores niveles de expresión de los genes *CycA1*, *CycD3* en los estadios de pre-antesis y antesis, mientras que en post-antesis la actividad de estos genes fue menor (figuras 58A y 58C).

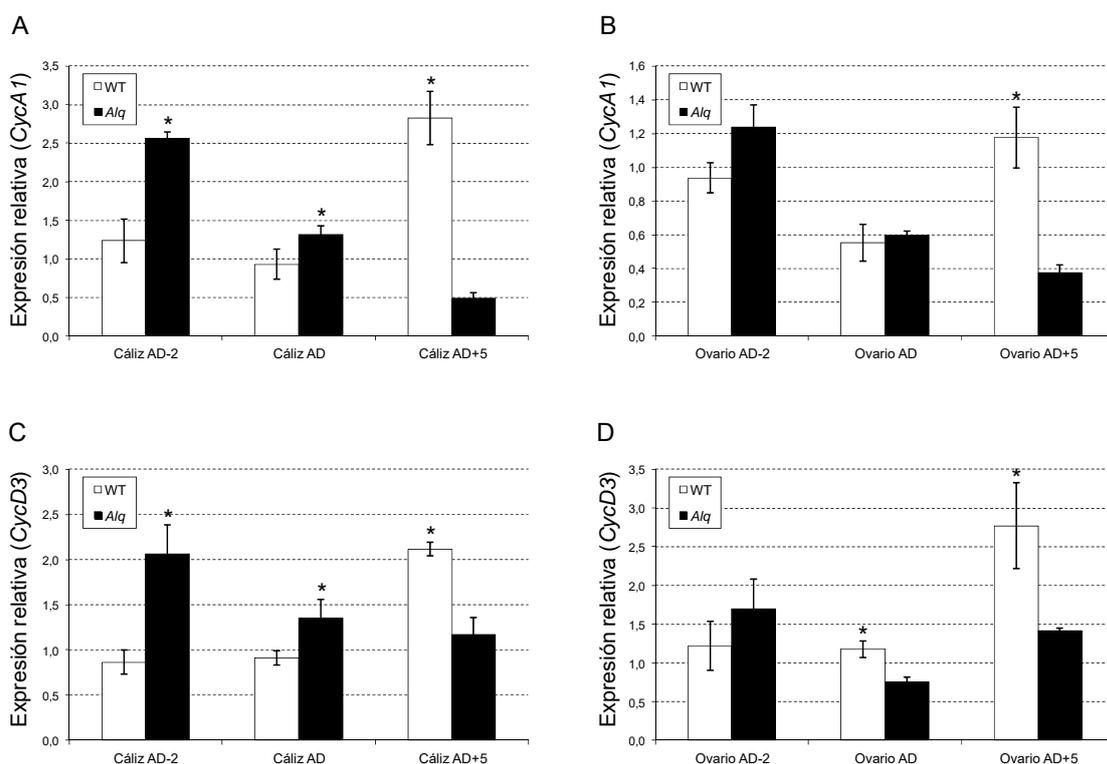


Figura 58. Expresión relativa de los genes *CycA1* y *CycD3* en cálices (A) y ovarios (B) del WT y de *Alq* en estadios de pre-antesis (2 días previos a la antesis), antesis y post-antesis (5 días posteriores a la antesis).

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

En cálices no se detectaron cambios en los niveles de expresión del gen *CDKA1* (figura 59A). Por lo que respecta a *SIWUS*, el nivel de expresión en cálices fue mayor en pre-antesis, aunque en los estadios de antesis y post-antesis se detectaron niveles significativamente menores (figura 59C). En los ovarios de las flores *Alq*, el nivel de expresión del gen *CycA1* era significativamente menor en post-antesis y algo similar ocurría con el gen *CycD3* en los estadios de antesis y post-antesis (figuras 58B y 58D). Por el contrario, el nivel de expresión del gen *CDKA1* fue significativamente mayor en los ovarios *Alq* en pre-antesis y antesis (figura 59B). Además, el nivel de expresión de *SIWUS* fue significativamente mayor en los ovarios *Alq* en todos los estadios florales analizados (figura 59D).

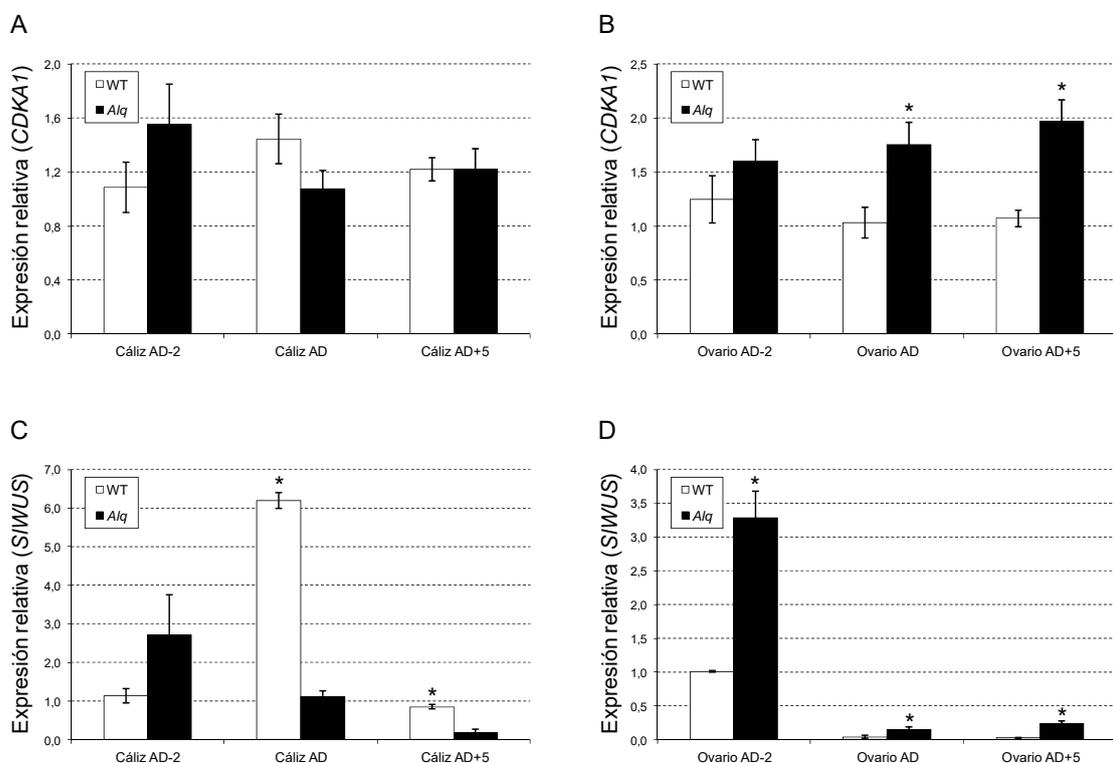


Figura 59. Expresión relativa de los genes *CDKA1* y *SIWUS* en cálices (A) y ovarios (B) del WT y de *Alq* en estadios de pre-antesis (2 días previos a la antesis), antesis y post-antesis (5 días posteriores a la antesis).

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

4.3.6. Contenido endógeno de hormonas en ovarios del mutante *Alq*

El análisis de hormonas reveló que los niveles de GA_1 y varias citoquininas eran significativamente mayores en los ovarios del mutante *Alq*, mientras que el nivel de ABA era menor. El contenido de GA_4 era similar en el mutante y en el WT (figura 60A); sin embargo, el de GA_1 era mayor en los tres estadios florales analizados y las diferencias eran significativas en el estadio de antesis (figura 60B). Por lo que respecta al ABA, la concentración de esta hormona era

significativamente menor en los estadios correspondientes a 5 y 2 días previos a la antesis (figura 60C). También se analizó el nivel de IAA y, aunque las diferencias entre el WT y *Alq* no resultaron significativas en ninguno de los estadios analizados, se detectó un incremento notable de esta hormona en los ovarios en pre-antesis (AD -2) de *Alq* (figura 60D).

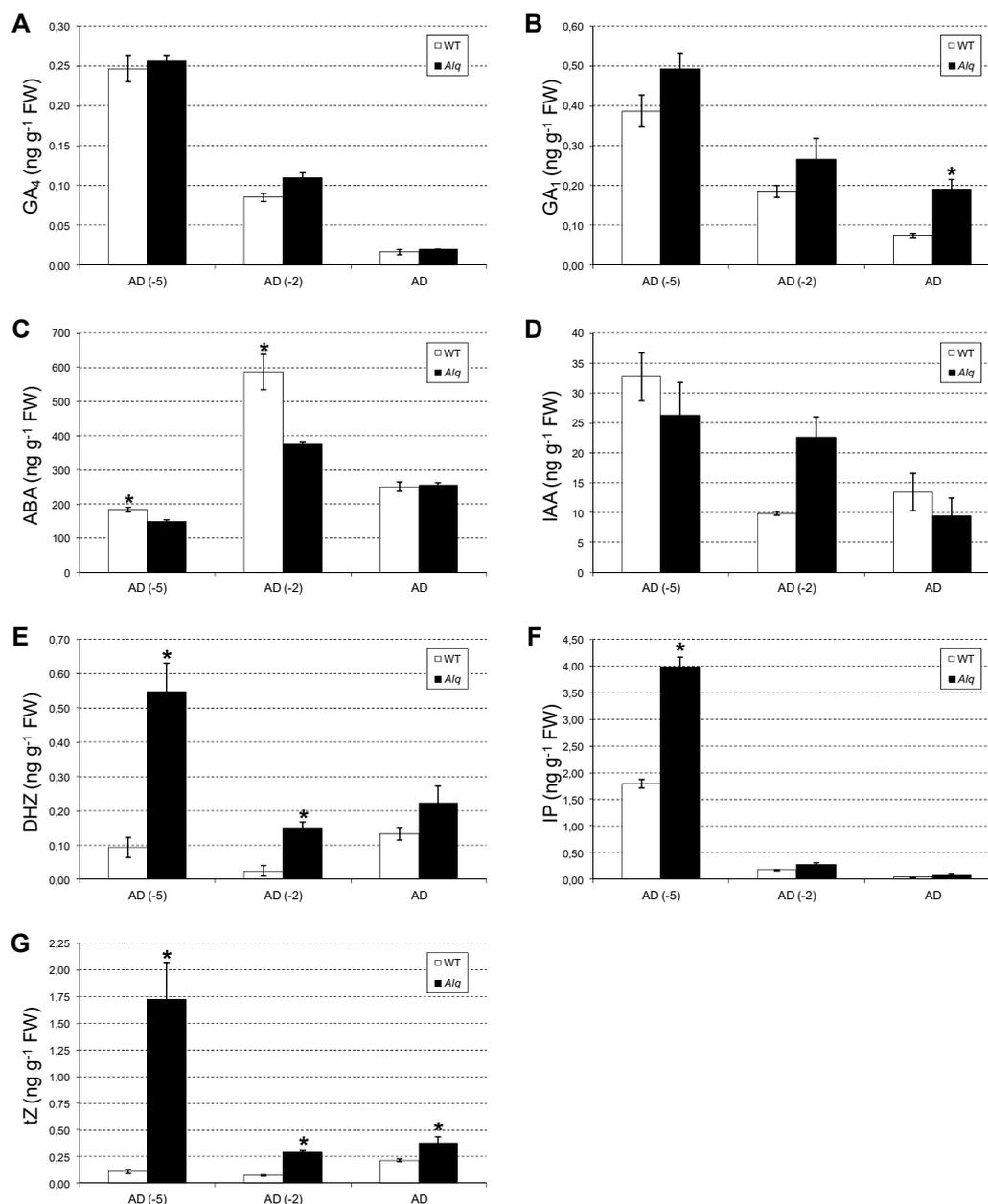


Figure 60. Nivel endógeno de diferentes hormonas en ovarios de plantas WT y *Alq*. El análisis se llevó a cabo en ovarios en los estadios de 5 días pre-antesis (AD -5), 2 días pre-antesis (AD -2) y antesis (AD). (A, B) GA₄ y GA₁: giberelinas GA₄ and GA₁, (C) ABA: ácido abscísico, (D) IAA: ácido indolacético, (E) DHZ: dihydro-zeatina, (F) IP: isopenteniladenina y (G) tZ: trans-zeatina. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Por lo que respecta a las citoquininas, los ovarios *Alq* contenían niveles de DHZ, IP y tZ significativamente mayores en el estadio de pre-antesis -5 (figuras 60E-60G). En concreto, el nivel de DHZ era 485 veces mayor, el de IP 122 veces mayor y el de tZ más de 1400 veces mayor. Además, el contenido de DHZ fue significativamente mayor en el estadio de pre-antesis -2 (500 veces mayor) y el de tZ fue significativamente mayor tanto en el estadio de pre-antesis -2 (290 veces mayor) como en el estadio de antesis (75 veces mayor). Estos resultados parecen indicar que el cuajado prematuro del fruto en el mutante *Alq* está mediado principalmente por el incremento de los niveles de citoquininas en los ovarios.

4.3.7. Cuajado de fruto en plantas con menores niveles del gen *ALQ*

Para saber cuál era el efecto del silenciamiento del gen *ALQ* sobre el cuajado del fruto, evaluamos la producción de fruto en plantas con el gen *ALQ* silenciado mediante la técnica de interferencia por RNA (RNAi *ALQ*). Además, teniendo en cuenta las funciones redundantes de los genes *TAG1* y *ALQ* (i.e. *TAGL1*) en el desarrollo reproductivo de tomate (Giménez et al, 2016), también se evaluó la producción de fruto tanto en plantas con el gen *TAG1* silenciado (RNAi *TAG1*) como en plantas con ambos genes silenciados (RNAi *TAG1/TAGL1*).

Tabla 19. Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo en plantas WT (MoneyMaker) RNAi *ALQ*, RNAi *TAG1* y RNAi *ALQ/TAG1*.

Los valores se expresan como la media \pm error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Parámetros	WT	RNAi <i>ALQ</i>	RNAi <i>TAG1</i>	RNAi <i>ALQ/TAG1</i>
Flores por inflorescencia	12,36 \pm 1,35 (a)	9,94 \pm 0,55 (b)	12,31 \pm 0,92 (a)	11,46 \pm 0,46 (a)
Frutos por inflorescencia	4,93 \pm 0,50 (a)	2,46 \pm 0,18 (b)	0,32 \pm 0,18 (c)	0
Tasa de cuajado (%)	43,13 \pm 2,82 (a)	27,09 \pm 2,69 (b)	2,25 \pm 1,45 (c)	0
Peso del fruto (g)	50,32 \pm 1,10 (a)	43,26 \pm 2,37 (a)	39,48 \pm 7,65 (a)	0
Producción por planta (g)	1487,59 \pm 146,31 (a)	713,62 \pm 63,66 (b)	166,39 \pm 98,67 (c)	0

En las plantas RNAi *TAG1* la mayor parte de los frutos que cuajaban eran pequeños, huecos (i.e. sin mucílago) y, por tanto, carecían de semilla (parecidos a los que se pueden ver en la figura 48B, aunque de menor calibre). Debido a sus características, nos pareció conveniente no tener en cuenta estos frutos a la hora de calcular los valores medios y esto explica la baja tasa de cuajado así como la menor producción de las plantas RNAi *TAG1* (tabla 19). En las plantas RNAi *ALQ*

observamos una importante reducción de la tasa de cuajado de fruto, a pesar de que desarrollaron menos flores por inflorescencia que en el WT (tabla 19). Además, la producción de fruto disminuyó significativamente. En efecto, la producción de las plantas RNAi *ALQ* fue un 50% menor que en las plantas WT (tabla 19). Respecto al peso del fruto, no se detectaron diferencias significativas entre el WT y las plantas RNAi *ALQ* y RNAi *TAG1*. Como se puede ver en la tabla 19, lo más interesante fue la ausencia de cuajado de fruto en las plantas con los dos genes silenciados. Los resultados indican que el silenciamiento de *ALQ* disminuye significativamente la tasa de cuajado de fruto y, por ende, la producción. Además, el cuajado se inhibe completamente cuando *TAG1*, un gen con efectos redundantes en el desarrollo reproductivo de tomate, se silencia conjuntamente con *ALQ*.

4.3.8. Cuajado de fruto del mutante *Alq* en condiciones de moderada salinidad

Los resultados del experimento realizado *in vitro* con el mutante sugirieron que su mayor vigor vegetativo y una arquitectura radicular distinta permiten que *Alq* tolere mejor ciertas condiciones de estrés (i.e. estrés osmótico). Además, el cuajado de fruto de *Alq* ocurre principalmente en ausencia de polinización y fecundación. Por estas razones, realizamos un experimento en condiciones de moderada salinidad para ver si, en términos de cuajado y producción de fruto, el mutante *Alq* exhibía un mejor comportamiento. Las plantas se cultivaron en condiciones control (sin NaCl) e irrigadas con una solución nutritiva salina (50 mM de NaCl). El riego con sal se inició cuando las plantas habían desarrollado 6 hojas verdaderas y el tratamiento salino se mantuvo hasta el final del experimento.

En ausencia de estrés, el cuajado de fruto verdadero (i.e. derivado del ovario) fue significativamente mayor en *Alq*. Al igual que se vio en el primer experimento (ver tabla 13 y figura 62), la mayor tasa de cuajado del mutante *Alq* era consecuencia del desarrollo de un mayor número de frutos, incluso a pesar de que en este experimento las plantas *Alq* desarrollaron menos flores por inflorescencia (tabla 20). De nuevo observamos que el mayor cuajado y, la ausencia de semillas en la mayor parte de los frutos de *Alq*, repercutía sobre el calibre del fruto. En este sentido, el peso medio de los frutos WT fue significativamente mayor que el de los frutos *Alq*. Por lo que respecta a la producción y con independencia de que se tuvieran o no en cuenta los frutos

derivados del cáliz, no se detectaron diferencias significativas entre las plantas WT y *Alq*.

En condiciones salinas, tanto el número de flores como el de frutos de las plantas WT disminuyeron significativamente respecto al cultivo sin sal. Sin embargo, estos parámetros no se vieron afectados en las plantas *Alq*. En efecto, las plantas *Alq* desarrollaron unas 9 flores en ausencia de estrés y un número similar en condiciones salinas. Respecto a los frutos, las plantas *Alq* desarrollaron 7 frutos en ausencia de sal y casi 8 en condiciones salinas (figura 62).

Tabla 20. Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo en plantas WT y *Alq* cultivadas en condiciones control (sin sal) y de moderada salinidad (50 mM NaCl).

Los valores se expresan como la media \pm error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

Parámetros		Sin estrés salino		Con estrés salino (50 mM NaCl)	
		WT	<i>Alq</i>	WT	<i>Alq</i>
Flores por inflorescencia		11,09 \pm 0,27 (a)	9,25 \pm 0,39 (b)	8,26 \pm 0,21 (c)	9,30 \pm 0,28 (b)
Frutos derivados del ovario	Frutos por inflorescencia	3,08 \pm 0,43 (b)	7,05 \pm 0,46 (a)	2,01 \pm 0,23 (c)	7,88 \pm 0,43 (a)
	Tasa de cuajado (%)	27,45 \pm 3,72 (b)	75,11 \pm 2,66 (a)	25,29 \pm 2,91 (b)	84,33 \pm 3,45 (a)
	Peso del fruto (g)	46,72 \pm 1,10 (a)	22,89 \pm 3,90 (b)	29,03 \pm 1,38 (b)	16,22 \pm 1,23 (c)
	Producción por planta (g)	1097,56 \pm 118,98 (a)	928,67 \pm 78,95 (a)	599,40 \pm 74,62 (b)	834,95 \pm 99,96 (ab)
Frutos derivados del cáliz	Frutos por inflorescencia	n.d.	8,58 \pm 0,29 (a)	n.d.	9,28 \pm 0,29 (a)
	Tasa de cuajado (%)	n.d.	93,20 \pm 3,32 (a)	n.d.	99,77 \pm 0,23 (a)
	Peso del fruto (g)	n.d.	4,55 \pm 0,27 (a)	n.d.	3,41 \pm 0,20 (b)
	Producción por planta (g)	n.d.	245,70 \pm 13,52 (a)	n.d.	216,87 \pm 13,38 (a)
Frutos derivadas de ovario y cáliz	Frutos por inflorescencia	3,08 \pm 0,43 (b)	8,58 \pm 0,29 (a)	2,01 \pm 0,23 (c)	9,28 \pm 0,29 (a)
	Tasa de cuajado (%)	27,45 \pm 3,72 (b)	93,20 \pm 3,32 (a)	25,29 \pm 2,91 (b)	99,77 \pm 0,23 (a)
	Peso del fruto (g)	46,72 \pm 1,10 (a)	27,34 \pm 4,18 (b)	29,03 \pm 1,38 (b)	19,63 \pm 1,41 (c)
	Producción por planta (g)	1097,56 \pm 118,98 (a)	1170,59 \pm 83,22 (a)	599,40 \pm 74,62 (b)	1051,82 \pm 112,10 (a)

En ambas líneas (WT y *Alq*), el estrés salino afectó significativamente al peso de los frutos, aunque las reducciones de peso fueron más dramáticas en el WT (tabla 21).

Tabla 21. Comparación relativa del desarrollo reproductivo de las líneas tratadas con sal con respecto a la condición control (i.e. sin sal) tanto en el WT (i.e. WT con sal vs WT sin sal) como en *Alq* (i.e. *Alq* con sal vs *Alq* sin sal).

Para cada uno de los parámetros, * indica diferencias estadísticamente significativas entre la condición control y la condición salina.

Parámetros	WT	<i>Alq</i> (fruto)	<i>Alq</i> (fruto + cáliz)
Frutos por inflorescencia	↓↓ (-34,7%) *	↑ (+11,7%)	~↑ (+8,2%)
Tasa de cuajado (%)	~↓ (-7,8%)	↑ (+12,3%)	~↑ (+7,1%)
Peso del fruto (g)	↓↓ (-37,9%) *	↓ (-29,1%) *	↓ (-28,2%) *
Producción por planta (g)	↓↓ (-45,4%) *	~↓ (-10,1%)	~↓ (-10,4%)

En este sentido, casi el 50% de los frutos que cuajaron en el WT en condiciones no salinas tenía un peso igual o mayor a 50 g, aproximadamente la otra mitad pesaban entre 20 y 50 g, y una pequeña proporción pesaba menos de 20 g. En condiciones salinas sólo el 3% de los frutos eran de 50 g, casi el 75% pesaban entre 20 y 50 g y más del 20% pesaban menos de 20 g (figura 61). En todos estos rangos de peso se detectaron diferencias significativas. Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas cuando se compararon esos rangos de peso en *Alq* (figura 61).

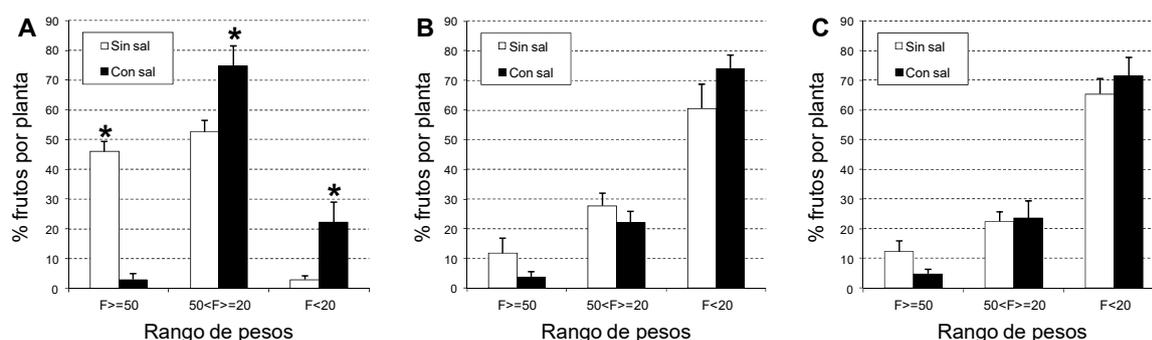


Figura 61. Porcentaje de frutos en cada planta por rango de pesos. A) WT, B) *Alq* (frutos derivados del ovario) y C) *Alq* (frutos derivados del ovario y del cáliz).

Para cada rango de pesos, * indica diferencias estadísticamente significativas entre la condición control y la condición salina.

Lo más interesante fue que las plantas *Alq* eran capaces de mantener la producción de fruto bajo las condiciones de moderada salinidad. En las plantas WT, la producción por planta fue significativamente menor en condiciones salinas (599,4 g vs 1097,6 g, tabla 20), lo que representó una disminución del rendimiento

de más del 45% (tabla 21). Sin embargo, la producción por planta en *Alq* alcanzó 928 g en condiciones no salinas y 834 g en condiciones salinas considerando sólo los frutos derivados del ovario. Teniendo en cuenta también los frutos derivados del cáliz la producción ascendía a 1170 g en condiciones no salinas y 1051 g en condiciones salinas. En ambos casos, la producción de fruto no se vio significativamente reducida por el efecto del estrés salino.

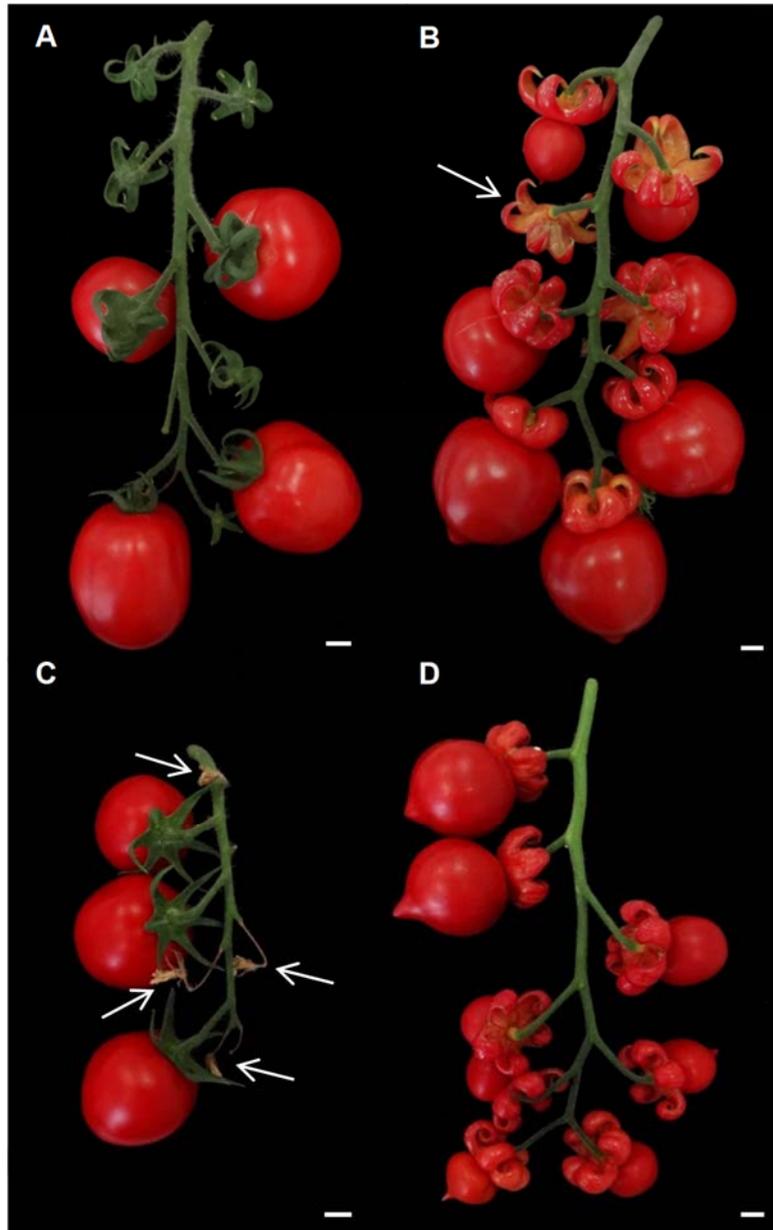


Figura 62. Frutos en inflorescencias de plantas WT (A, C) y *Alq* (B, D) en ausencia de estrés salino (A, B) y condiciones de moderada salinidad (C, D). Las inflorescencias *Alq* producen más frutos por inflorescencia tanto en condiciones control como salinas.

Las flechas señalan una flor en la que sólo se ha producido el cuajado en fruto del cáliz *Alq* y flores que se han secado en plantas WT cultivadas en condiciones de estrés.

Escala de barras: 1 cm

5. Discusión

5.1. Los mutantes *Lfs2084* y *Lfs2448* exhiben menor tasa de cuajado de fruto

El cuajado del fruto es uno de los caracteres de mayor trascendencia económica puesto que contribuye a la producción de un cultivar. Este proceso representa la primera etapa del desarrollo de un fruto y depende del éxito de la polinización y de la fecundación (Gillaspi, 1993). El cuajado de fruto está regulado en gran medida por señales hormonales, especialmente auxinas y giberelinas, ya que tras la polinización se produce una regulación positiva de los genes de respuesta a estas dos hormonas (de Jong et al, 2009). En tomate se han descrito diversos genes que se activan o reprimen a lo largo de las primeras etapas del desarrollo del fruto (Wang et al, 2009), y se ha demostrado que la inactivación de algunos reguladores genéticos induce el desarrollo de fruto en ausencia de polinización (Wang et al, 2005; Goetz et al, 2007; de Jong et al, 2009; Klap et al, 2016; Rojas-Gracia et al, 2017). Sin embargo, aún no se han identificado todos los genes que tienen un papel clave en este proceso. La identificación y posterior análisis de mutantes afectados en la tasa de cuajado es una de las mejores estrategias para lograr este propósito.

Las investigaciones realizadas en esta Tesis Doctoral han hecho factible la identificación de dos mutantes de tomate afectados en la tasa de cuajado de fruto, a saber, *Lower fruit setting 2084* y *2448* (*Lfs2084* y *Lfs2448*). La caracterización genética demostró que ambas mutaciones presentan un patrón de herencia autosómica dominante y están ocasionadas por insertos de T-DNA. En el mutante *Lfs2084* la tasa de cuajado disminuye en casi un 85% respecto a lo que ocurre en el WT, mientras que en *Lfs2448* la disminución es de en torno al 50%. En ambos mutantes, las flores producen menor cantidad de polen funcional. Los resultados

obtenidos indican, pues, que los genes afectados en los dos mutantes desempeñan un papel importante en el proceso del desarrollo del polen. La menor calidad del polen en estos dos mutantes podría ser una de las causas de la menor tasa de cuajado de fruto. Con todo, la mutación *Lfs2084* también determina alteraciones en el pistilo que parecen conducir, en última instancia, a una menor receptividad estigmática y a una disminución del tránsito de los tubos polínicos a través del estilo, lo que podría explicar la escasa tasa de cuajado de este mutante.

5.2. Las mutaciones *Lfs2084* y *Lfs2448* conducen a letalidad del gameto masculino

La formación del gametófito a partir del esporófito es el resultado de dos procesos secuenciales, la esporogénesis y la gametogénesis (Yang y Sundaresan, 2000). Durante la esporogénesis se produce el tejido esporogénico que posteriormente sufre divisiones meióticas para dar lugar a las microsporas y megasporas. En las plantas superiores, los programas del desarrollo que conducen a la formación de órganos masculinos y femeninos son independientes, y muchas de las mutaciones que se han identificado alteran la funcionalidad del polen pero no tienen efectos sobre la fertilidad femenina. Los análisis genéticos en una amplia variedad de plantas han indicado que la mayor parte de las mutaciones que conducen a infertilidad masculina están controladas por genes nucleares. La mayoría de los mutantes descritos con esterilidad masculina son esporofíticos en su modo de herencia y mecanismo de acción (Chaudhury, 1993). Este tipo de mutantes suele tener un modo de herencia recesivo, es decir, las plantas heterocigóticas para la mutación producen polen normal, y el alelo mutante puede transmitirse a la siguiente generación. Sin embargo, todos los granos de polen de plantas homocigóticas para el alelo mutante se encuentran afectados en el interior de la antera. Estas mutaciones afectan a etapas clave de la meiosis y, por ello, se denominan mutantes meióticos (revisado por Caryl et al, 2003). Por el contrario, los mutantes con esterilidad gametofítica masculina afectan a genes que actúan después de la meiosis (mutantes post-meióticos), en la fase haploide del desarrollo del polen, y por lo tanto, solo los granos de polen que portan el alelo mutante se ven afectados. Es decir, en estos mutantes, la mitad del polen de las plantas heterocigóticas para la mutación es inviable; y el fenotipo mutante sólo puede ser transmitido por la vía materna (McCormick, 2004).

Como se comentaba en el apartado anterior, la caracterización de los mutantes *Lfs2084* y *Lfs2448* indicó que las flores de ambos mutantes producían menor cantidad de polen funcional. Una caracterización más detallada permitió descubrir un fenómeno de letalidad del gameto masculino asociado a ambas mutaciones. En *Lfs2084*, ninguna de las plantas obtenidas a partir del cruce WT ♀ x *Lfs2084* ♂ contenían el inserto y todas tenían fenotipo WT, mientras que el cruce *Lfs2084* ♀ x WT ♂ generaba plantas WT sin inserto y mutantes con inserto en la misma proporción (i.e. 1 : 1). En *Lfs2448*, la progenie (⊗) de plantas heterocigóticas para el alelo mutante segregaba plantas WT sin inserto y mutantes con inserto en una proporción 1 : 1. El genotipado de la población segregante mediante PCR indicó que las plantas WT no contenían alelo mutante mientras que todas las plantas mutantes contenían el alelo mutante en configuración heterocigótica. Estos resultados indican la participación de un único locus mutante que genera esterilidad masculina a nivel gametofítico. Sin embargo, la degeneración del grano de polen ocurría en estadios de desarrollo diferentes en cada uno de los mutantes. En el mutante *Lfs2084*, la degeneración de los granos de polen parecía producirse durante la etapa de microgametogénesis, toda vez que las primeras alteraciones fueron evidentes durante el estadio de pre-antesis floral, es decir, en la etapa de polen bicelular temprano. En el mutante *Lfs2448*, sin embargo, también se observaron alteraciones durante la última fase de la microsporogénesis, en concreto, en estadios florales en los que el polen se encuentra en etapa de tétrada.

En *Arabidopsis* se han descrito varios mutantes con esterilidad gametofítica masculina como consecuencia de la disrupción de genes que regulan la división asimétrica y la formación de la línea germinal masculina, genes implicados en la división de células germinales o genes asociados con la especificación de línea germinal (revisado en Borg et al, 2009). En maíz, la mutación *gametophytic male sterile-1* (*gaMS-1*), identificada en un programa de mutagénesis insercional con transposones, promueve la degeneración del polen durante o inmediatamente después de la primera división mitótica de la microspora (Sari-Gorla et al, 1996). El mapeado de *gaMS-1* mediante diferentes tipos de marcadores localizó dicho locus en el brazo corto del cromosoma 2 (Fink et al, 2001). En tomate se ha demostrado que el gen *LeProT1* codifica un transportador de prolina y se expresa específicamente en polen maduro (Schwacke et al, 1999). Los autores sugieren que *LeProT1* facilita la entrada de prolina y solutos compatibles necesarios para el desarrollo del polen y su germinación. La anulación de la función de este gen

podría promover letalidad gamética masculina, aunque no se ha demostrado. De hecho, su homólogo en *Arabidopsis*, *AtProT1*, también exhibe un elevado nivel de expresión en polen maduro (Lehmann et al, 2011). Sin embargo, la mutación *prot1-1* no altera la viabilidad del polen, probablemente debido a que el gen *ProT3* es capaz de complementar funcionalmente la ausencia de función de *ProT1* (Biancucci et al, 2015). Más recientemente, la inserción de un transposón en el gen *SIGWD* (codifica una enzima implicada en la fosforilación del almidón) causó letalidad gamética masculina en tomate (Nashilevitz et al, 2009). La síntesis de almidón ocurre en etapas tempranas del desarrollo del polen de tomate, después de la primera mitosis haploide, y es hidrolizado a lo largo de las etapas posteriores. El proceso se completa después de la deshidratación de la antera, momento en el que el grano de polen ya no contiene almidón (Pacini y Franchi, 1998; Polowick y Sawhney, 1993). Según Nashilevitz et al (2009), la letalidad gametofítica en el mutante insercional *legwd::Ds* se debe a una elevada acumulación de almidón y niveles reducidos de azúcares en los granos maduros de polen que ocasionan una reducción de la germinación del polen.

Como se comentaba en un párrafo anterior, la mayoría de los mutantes con esterilidad masculina son esporofíticos. En especies de interés agronómico se han identificado pocos mutantes gametofíticos masculinos y en *Arabidopsis* se han identificado no más de una docena. La disponibilidad de mutantes con esterilidad gametofítica masculina en otras especies distintas a *Arabidopsis* ofrecería la oportunidad de identificar los genes que están implicados en el desarrollo post-meiótico del polen. Además, estos mutantes no tienen afectada la fertilidad femenina. Por tanto, los genes alterados permitirían generar plantas andro-estériles mediante tecnologías basadas en CRISP-Cas9, lo que tendría un enorme interés en los programas de mejora.

5.3. La mutación *Lfs2084* altera la ruta MEP

El análisis del contenido endógeno de hormonas del mutante *Lfs2084* indicó que, respecto al WT, las concentraciones de ácido abscísico (ABA) y giberelina 1 (GA_1) disminuían mientras que el nivel de zeatina (Z) aumentaba, en todos los casos de manera significativa. Además, en *Lfs2084* se detectó menor concentración de ácido indolacético (IAA) y mayor de jasmónico (JA), aunque las diferencias no resultaron significativas desde un punto de vista estadístico.

Se ha reportado que las citoquininas tienen un efecto inductor sobre los tricomas, especialmente en inflorescencias (Ishida et al, 2008). Un efecto similar

tiene el ácido jasmónico, al que se le ha asignado un efecto positivo tanto sobre la densidad como sobre el número de tricomas en hojas (Traw et al, 2003). Los mayores niveles de citoquinina y ácido jasmónico en *Lfs2084* podrían explicar la mayor densidad de tricomas que se observó en hojas (ver figura 15) y especialmente en inflorescencias (figura 19).

El papel fundamental que desempeñan las auxinas y giberelinas durante el cuajado del fruto ha sido extensamente documentado. Diferentes ejemplos ilustran el papel que desempeñan estas hormonas en el cuajado del fruto de tomate: i) el efecto de la polinización y fertilización de la flor (i.e. cuajado del fruto) puede ser mimetizado mediante la aplicación exógena de ambas hormonas, ii) el desarrollo de frutos partenocárpicos está asociado a mayores niveles endógenos de auxinas y giberelinas (Gorguet et al, 2004), y iii) se ha demostrado que la manipulación genética de las rutas biosintéticas de auxina y giberelinas promueve cuajado independiente de polinización (Pandolfini, 2009). Por otro lado, se ha propuesto que las giberelinas producidas por el polen pueden desempeñar un importante papel en la biosíntesis de auxina en el ovario, actuando como una señal que desencadena el cuajado de fruto (revisado en Srivastava y Handa, 2005). Comoquiera que la GA₁ es la forma activa que induce el desarrollo del fruto de tomate (Serrani et al, 2007), los menores niveles de IAA y GA₁ detectados en *Lfs2084* son coherentes con la escasa tasa de cuajado de fruto en el mutante.

Respecto al ABA, se ha descrito que es una de las hormonas inductoras de esterilidad masculina. En tomate, la aplicación exógena de ABA interrumpe el desarrollo de las anteras y causa aborto del polen (Rastogi y Sawhney, 1988; Chandra Sekhar y Sawhney, 1991). *Stamenless-2 (sl-2)*, un mutante de tomate con esterilidad masculina estructural debido a la anomalía en el desarrollo de las anteras, tiene mayores contenidos de ABA en tejidos vegetativos y florales que el WT (Singh y Sawhney, 1997). Los mayores niveles de ABA se detectaron en anteras coincidiendo con el momento en el que aparecían las alteraciones en este órgano. A priori, no parece que exista una asociación clara entre la menor fertilidad del polen observada en *Lfs2084* y la menor concentración de ABA. Sin embargo, los menores niveles de ABA en el mutante podrían estar asociados a alteraciones en la ruta que conduce a la síntesis de ABA. En tomate se ha observado un color amarillo más pálido en la corola de flores transgénicas que tienen silenciado *LeZEP1*, un gen que codifica para zeaxantina epoxidasa (Taylor et al, 2000). Este fenotipo se asoció a una mayor acumulación de zeaxantina en la

corola de las plantas transgénicas. Las flores del mutante *Lfs2084* tienen pétalos de color amarillo pálido (ver figura 19) y son muy parecidas a las de las plantas transgénicas que tienen silenciado *LeZEP1* (Taylor et al 2000: “*Control of abscisic acid synthesis*”, figura 2). De hecho, las flores de esas plantas transgénicas parecen tener mayor densidad de tricomas (Taylor et al 2000; figura 2), como ocurre en *Lfs2084*.

La síntesis de ABA, al igual que la de citoquininas y giberelinas, tiene como origen común el isopentenil pirofosfato. Las reacciones que conducen a la síntesis de las tres hormonas ocurren en la ruta MEP que, de forma simplificada, se puede ver en la figura 63.

El análisis de hormonas determinó que el mutante contenía más del doble de zeatina (Z) que el WT. Estas diferencias en la síntesis de citoquininas podrían implicar cambios en la síntesis de otras hormonas, como giberelinas o ABA. Distintas investigaciones han mostrado que existen interacciones entre citoquininas y giberelinas en procesos relacionados con la síntesis, catabolismo y señalización de ambas hormonas (Fleishon et al, 2010). Por ejemplo, la sobre-expresión de genes *rol* de *Agrobacterium tumefaciens* en tabaco y patata incrementa la concentración endógena de citoquininas y reduce el contenido de GA₁ (Schmülling et al, 1993). Además, cuanto mayor es el nivel de expresión del transgén mayor es el desequilibrio entre las dos hormonas. Se ha demostrado que los reguladores del mantenimiento del meristemo apical (SAM) de la familia KNOX alteran la homeostasis entre las dos hormonas. Una de las vías hormonales controladas por proteínas de la familia KNOX es la ruta biosintética de citoquininas (Ori et al, 1999). En el mutante de ganancia de función *Kn1-N* de maíz, que sobre-expresa citoquininas, se produce una menor acumulación de giberelinas (Bolduc y Hake, 2009). Según los autores, *KN1* modula negativamente la acumulación de giberelinas mediante el incremento de expresión de *GA2ox1*, un enzima implicado en la inactivación de giberelinas bioactivas. Por el contrario, en el mutante nulo *kn1-e1*, se produce una regulación negativa de la expresión de *GA2ox1*. Años antes, se había observado que los niveles de transcrito de *GA20ox1* (enzima de biosíntesis) eran muy bajos en plantas de *Arabidopsis* que sobre-expresaban las proteínas KNOX SHOOT MERISTEMLESS o BREVIPEDICELLUS (Hay et al, 2002).

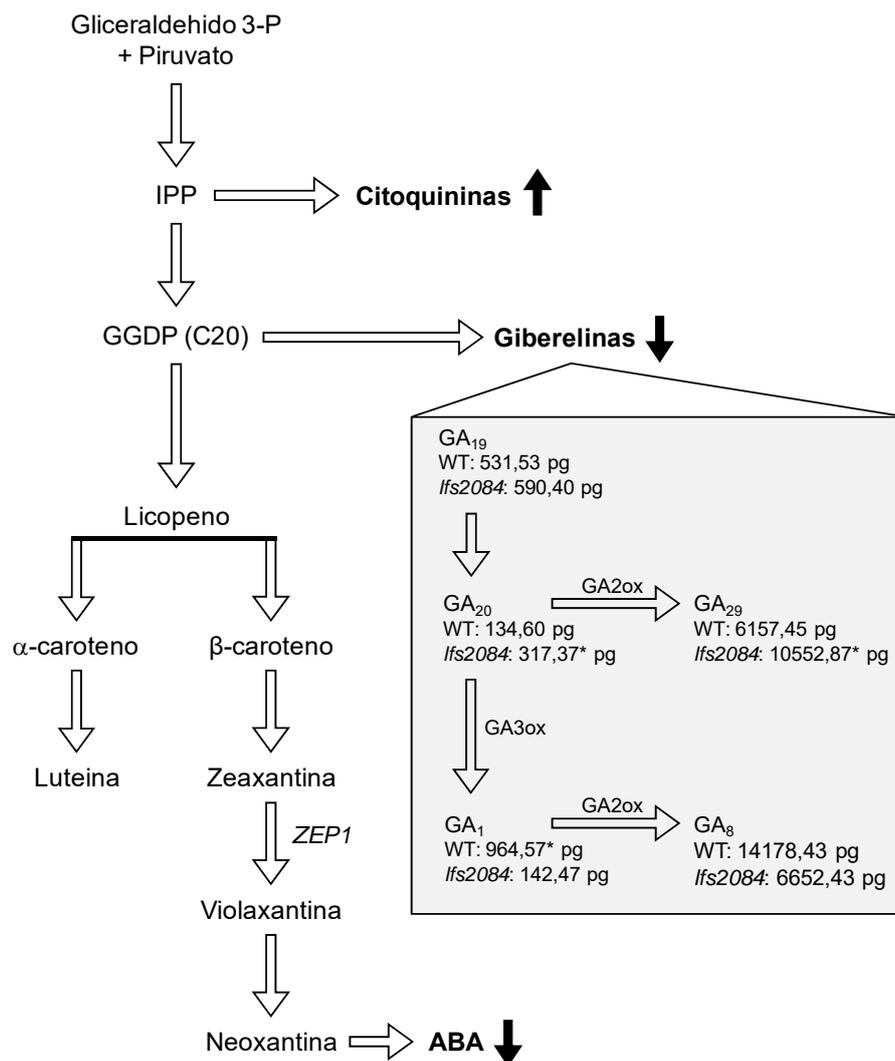


Figura 63. Ruta simplificada de la 2C-metil-eritrol 4-fosfato (MEP) en plantas que conduce a la síntesis de citoquininas, giberelinas y ácido abscísico (ABA), y contenido de algunas giberelinas de la ruta de la hidroxilación temprana en el C-13.

Las flechas negras indican si el contenido de esa hormona en *Lfs2084* se encuentra por encima (↑) o debajo (↓) del contenido detectado en el WT. Para cada hormona, * indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

IPP = Isopentenil pirofosfato, GGDP = Geranil geranil difosfato, ZEP1 = Zeaxantina epoxidasa.

Como se comentaba en el párrafo anterior, el contenido de zeatina se incrementa en más de un 200% en *Lfs2084* mientras que la biosíntesis de GA₁ se reduce en un 85% respecto al WT. El contenido de GA₁₉ fue similar en el WT y el mutante, pero el de GA₂₀ fue significativamente mayor en el mutante (figura 63). Esto parece deberse a que en el mutante se produce muy poca conversión de GA₂₀ a GA₁, la forma activa. Por otro lado, tanto en el WT como en el mutante se produce la conversión de GA₂₀ a GA₂₉, aunque los niveles significativamente mayores de GA₂₉ en el mutante parecen estar relacionados con la baja conversión

de GA₂₀ a GA₁. El bajo contenido de GA₁ en el mutante podría deberse a una menor actividad del enzima biosintético GA3ox (metaboliza GA₂₀ a GA₁), mientras que el alto contenido de GA₂₉ parece estar relacionado con una mayor actividad del enzima catabólico GA2ox, tal y como comentaremos en el siguiente apartado de la discusión. En conjunto, no se puede descartar que la menor acumulación de giberelinas esté mediada en parte por citoquininas a través de GA2ox.

Por lo que respecta a las interacciones entre las citoquininas y el ABA, se ha demostrado que estas dos hormonas desempeñan funciones antagónicas en plantas. Por tanto, la alteración de los niveles de una de estas dos hormonas podría alterar el contenido de la otra. A título de ejemplo, se ha demostrado que en plantas estresadas disminuye el contenido de citoquininas coincidiendo con una acumulación de ABA (Wilkinson et al, 2012). Sin embargo, en plantas estresadas tratadas con inhibidores de ABA, la reducción del contenido en citoquininas es mucho menor (Vysotskaya et al, 2009). Este fenómeno fue confirmado en experimentos que mostraban que la inducción de la expresión de genes que codifican para citoquininas oxidadas, que catalizan la degradación irreversible de la citoquininas, promueve incrementos de los niveles de ABA (Vysotskaya et al, 2009). En el caso contrario, la síntesis inducible de citoquininas (*pSAG12::ipt*) redujo significativamente la acumulación de ABA en flores de plantas transgénicas de petunia tratadas con etileno (Chang et al, 2003). Wang et al (2011) correlacionaron la insensibilidad a ABA del mutante de *Arabidopsis gim1* (*germination insensitive to ABA mutant 1*) con el aumento de los niveles endógenos de citoquininas (consecuencia de la sobre-expresión del gen *IPT8*). Los autores comprobaron que la ausencia de función de *IPT8* estaba asociada a una hipersensibilidad a ABA.

El mutante *Lfs2084* acumuló en torno al 25% menos de ABA que el WT. Teniendo en cuenta la interacción antagonista que existe entre estas dos hormonas (zeatina y ABA), no se puede descartar que la mayor acumulación de zeatina comporte menores contenidos de ABA. Además, el fenotipo de color pálido de la corola de las flores del mutante podría estar relacionado con una menor actividad del enzima que cataliza la síntesis de violaxantina (*ZEP1*, ver figura 63). La menor biosíntesis de violaxantina podría incrementar la acumulación de pigmentos carotenoides que se encuentra corriente arriba. La luteína y zeaxantina son las xantofilas más comunes en col rizada, espinaca, brócoli, guisantes y lechuga (Abdel-Aal et al, 2013). Por consiguiente, es posible que el

color verde más intenso de las hojas del mutante (ver figura 15) se deba a una mayor acumulación de estos dos pigmentos carotenoides como consecuencia de una menor síntesis de violaxantina (ver figura 63). En conjunto, los resultados parecen indicar que la mutación *Lfs2084* promueve cambios importantes en la ruta MEP que se reflejan en diferentes caracteres fenotípicos de la planta.

5.4. La mutación *Lfs2084* altera la expresión de genes implicados en el cuajado

Los enzimas GA2-oxidasas (GA2ox) regulan los niveles de giberelinas a través de la inactivación de giberelinas bioactivas (Ross et al, 1995). En ovarios polinizados de tomate se ha visto que los niveles de expresión de *SIGA2ox1* no disminuyen a los 10 días de post-antesis y mantienen niveles de expresión similares a los que exhiben los ovarios no polinizados (Serrani et al, 2007). Esto explica la ausencia de diferencias entre el nivel de transcrito de *SIGA2ox1* en los ovarios del mutante *Lfs2084* y el WT en los estadios de antesis o 5 días post-antesis. Según Serrani et al (2007), el nivel de expresión de *SIGA2ox2* en ovarios polinizados y no polinizados de tomate era similar a los 5 días de antesis; sin embargo, disminuía significativamente en ovarios polinizados a los 10 días de antesis (Serrani et al, 2007). Nosotros observamos que los niveles de expresión de *SIGA2ox2* eran similares en el mutante y el WT en pre-antesis. Sin embargo, a partir del estadio de antesis, *SIGA2ox2* se expresaba con mayor intensidad en *Lfs2084*, lo que sugiere la ausencia de polinización o fecundación en el mutante y, por tanto, de cuajado.

Se ha observado que los genes *GA2ox* se encuentran sobre-expresados en anteras del mutante estéril masculino de tomate *7B-1* (Omidvar et al, 2017). Los análisis de expresión *in situ* indicaron que la actividad de *GA2ox* se localizaba preferentemente en células del tapete y en microsporas binucleadas que habían detenido su crecimiento. Según los autores, la regulación al alza de *GA2ox* podría estar relacionada con una disminución del contenido de giberelinas bioactivas en anteras que promovería defectos en la muerte celular programada de las células del tapete. Nosotros analizamos la expresión de *SIGA2ox2* en anteras de *Lfs2084* y vimos que la expresión era significativamente mayor en el mutante a los 5 días de la antesis (figura 64). Teniendo en cuenta que *Lfs2084* es un mutante gametofítico y no sufre alteraciones en el tapete, los mayores niveles de expresión de *SIGA2ox2* deben estar relacionados con la detención del desarrollo de los granos de polen mutante.

Por otro lado, no se puede descartar, como se comentaba en el anterior apartado de discusión, que el mayor nivel de expresión de *SIGA2ox2*, tanto en ovarios como en estambres, esté ocasionado por la mayor acumulación de citoquininas en el mutante. Este mayor nivel de expresión conduciría a la degradación de giberelinas bioactivas promoviendo una mayor conversión de GA_{20} a GA_{29} y una baja conversión de GA_{20} a GA_1 , lo que repercutiría finalmente en la tasa de cuajado de fruto.

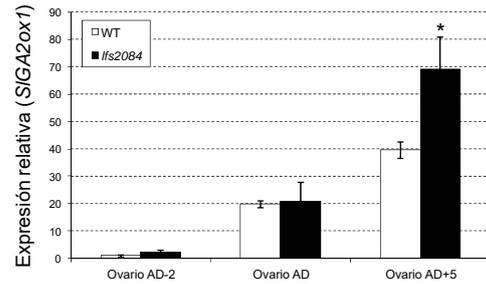


Figura 64. Expresión relativa de *SIGA2ox2* en anteras del WT y *lfs2084* en estadios de preantesis (2 días previos a la antesis), antesis y postantesis (5 días posteriores a la antesis).

* Indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

También hemos comprobado que *SIARF7*, miembro de la familia de factores de respuesta a auxina, experimentaba cambios importantes de expresión en el mutante *Lfs2084*. Los niveles de transcrito de *SIARF7* son elevados en ovarios de flores maduras pero disminuyen rápidamente tras la polinización (de Jong et al, 2009a), y su silenciamiento mediado por RNAi conduce al desarrollo de frutos partenocárpicos, sugiriendo su papel como regulador negativo del cuajado del fruto (de Jong et al, 2009b). Según de Jong et al (2011), *SIARF7* controla las respuestas a auxinas y giberelinas durante el inicio del desarrollo del fruto de tomate. Nuestros resultados son coherentes con la ausencia de cuajado del fruto del mutante. En plantas WT, el nivel de expresión de *SIARF7* experimentó una significativa reducción tras la antesis floral. Sin embargo, en *Lfs2084* se detectaron elevados niveles de transcrito en el estadio de 5 días posteriores a la antesis, similares a los detectados en el estadio de antesis.

La reducción de la expresión de *Tomato Agamous 1 (TAG1)* tras la antesis floral es uno de los eventos fundamentales que deben ocurrir para que se desencadene el cuajado de fruto (Wang et al, 2009). Los resultados de expresión de *TAG1* en *Lfs2084* son también coherentes con la ausencia de cuajado del fruto del mutante. En plantas WT, los niveles de transcrito de *TAG1* a los 5 días de la antesis disminuyeron más de cuatro veces respecto al estadio de antesis. En el mutante, sin embargo, no se detectaron diferencias en la acumulación de transcritos de *TAG1* entre los estadios de antesis y post-antesis (+5 días). En conjunto, los cambios en los niveles de expresión de diferentes genes implicados

en el cuajado del fruto de tomate son coherentes con el fenotipo de menor tasa de cuajado observado en el mutante.

5.5. El menor cuajado de fruto en el mutante *Lfs2448* está relacionado con la alteración de citocromos P450 (CYP450)

Las proteínas CYP450 son una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas presentes en bacterias, arqueas y eucariotas. La reacción monooxigenasa es la más comúnmente catalizada por CYP450, y consiste en la incorporación de un átomo de oxígeno procedente de oxígeno molecular (O₂) en un sustrato orgánico (RH) y la reducción del otro átomo de oxígeno a agua. En plantas, las proteínas CYP450 están implicadas en el metabolismo oxidante de compuestos endógenos tales como fenilpropanoides, que desempeñan una función importante en los procesos moleculares de interacción planta-patógeno, y glucósidos cianogénicos, que participan en la defensa frente a predadores de las plantas (Durst, 1991). Además, intervienen en la desintoxicación de herbicidas mediante reacciones que incluyen procesos de hidroxilación, desalquilación, desaminación, formación de sulfóxidos y deshalogenación (Bolwell et al, 1994). Más recientemente, se les ha relacionado con la biosíntesis de fitorreguladores del crecimiento como giberelinas, ácido abscísico y brasinoesteroides (Krochko et al, 1998, Fujioka y Yolota, 2003, Saito et al, 2004; Davidson et al, 2006).

En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado alrededor de 270 genes pertenecientes a 45 familias distintas del CYP450 (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). Uno de estos genes, *CYP78A9*, posee funciones claves en el desarrollo reproductivo de esta especie. En una colección de líneas de *Arabidopsis* generadas mediante activación transcripcional (*activation tagging*), Ito y Meyerowitz (2000) identificaron el mutante 28-5, capaz de desarrollar silicuas de enorme tamaño. El análisis de la inserción indicó que el fenotipo mutante estaba causado por la hiper-expresión del gen *CYP78A9*. Más recientemente, se ha comprobado que la sobre-expresión de *CYP78A9* es capaz de desacoplar el cuajado del fruto de la fertilización dando lugar a frutos sin semillas (Sotelo-Silveira et al, 2013). Además, la ausencia de función de *CYP78A9* detuvo el desarrollo del integumento externo del óvulo, dando lugar a esterilidad femenina.

En tomate, el gen *Dwarf*, identificado en un programa de mutagénesis insercional con transposones, fue uno de los primeros genes *CYP450* identificados en esta especie (Bishop et al, 1996). *Dwarf* está implicado en la

biosíntesis de brasinoesteroides y cataliza la C-6 oxidación de la 6-deoxocasterona a castasterona, precursor inmediato de los brasinólidos (Bishop et al, 1999). Montoya et al (2005), tras el análisis de los patrones de expresión de *Dwarf*, demostraron la importancia de la síntesis de los brasinosteroides durante el desarrollo del fruto. Más recientemente se ha demostrado que los citocromos P450 participan también en otros caracteres relevantes relacionados con el desarrollo del fruto. Así, *SIKLUH* (locus *fw3.2*), un citocromo P450 de la subfamilia CYP78A, es uno de los genes responsables del incremento del tamaño de fruto de tomate (Chakrabarti et al, 2013). Los citocromos P450, *SIC3H1* y *SIC3H2*, que codifican p-cumarato 3-hidroxilasas, están implicados en el color del estigma de la flor (Zhang et al, 2017). También se ha reportado la participación de un citocromo P450 (*CYP71A2*) en el proceso de maduración del fruto (Li et al, 2010).

Por otra parte, algunos citocromos P450 desempeñan una función relevante en el desarrollo del polen. En *Arabidopsis*, *CYP703A2* se expresa a partir del estadio de tétrada en células del tapete y microsporas, y la ausencia de su función promueve alteraciones en el desarrollo del polen y un fenotipo de esterilidad masculina (Morant et al, 2007). Los autores demostraron que la función de *CYP703A2* está relacionada con la síntesis de esporopolenina, necesaria para la formación de exina en los granos de polen. En arroz, el gen *CYP704B2*, implicado en la biosíntesis de esporopolenina y de cutina, es esencial para la formación de la exina de las microsporas y la cutícula de la antera durante el desarrollo de los órganos reproductores masculinos (Li et al, 2010).

Como se comentaba en un párrafo anterior, los citocromos P450 se han relacionado con algunos fitorreguladores del crecimiento como por ejemplo giberelinas. Desde hace tiempo se sabe que la deficiencia o insensibilidad a giberelinas ocasiona desarrollo anormal en anteras y, a menudo, conduce a esterilidad masculina. Por ejemplo, en el mutante *ga1-3* de *Arabidopsis*, el desarrollo de las células del tapete y de las microsporas se detiene antes de la mitosis, impidiendo la formación de polen maduro (Cheng et al, 2004). En tomate, el mutante deficiente en giberelinas *gib-1* detiene el desarrollo de la antera en estadio pre-meiótico (Jacobsen y Olszewski, 1991). *GAMYB*, un componente importante de la señalización de giberelinas en cereales, desempeña un papel importante en el desarrollo de los granos de polen. Se ha observado que el mutante *gamyb* exhibe defectos en la muerte programada de las células del

tapete y en la síntesis de exina (Aya et al, 2009). Curiosamente, una mutación de ausencia de función en el gen *CYP703A3*, un citocromo P450 hidroxilasa, da lugar a un fenotipo muy parecido al del mutante *gamyb*. Las investigaciones realizadas por Aya et al (2009) pusieron de manifiesto que las giberelinas regulan la muerte programada de las células del tapete y la síntesis de exina activando la función GAMYB a través de la vía de percepción GID1 / DELLA, lo que promueve una regulación positiva del citocromo P450 *CYP703A3*. Con todo, la relación entre las giberelinas y los citocromos P450 se había reportado previamente. Las giberelinas se sintetizan a través de una ruta compleja que involucra tres tipos de enzimas. Uno de esos enzimas son los citocromos P450 que catalizan algunas etapas de oxidación desde el ent-kaureno hasta la giberelina GA₁₂, el inicio de la ruta de la 13-hidroxilación (Davidson et al, 2006; Morrone et al, 2010). Liu et al (2015) observaron una consistente reducción de GA₁ y GA₄ en dos líneas mutantes de inserción *cyp715a1*. Estas líneas exhibían además una regulación a la baja de la ruta biosintética de auxinas. En este sentido, conviene indicar que los citocromos P450 también están implicados en la biosíntesis de auxinas (Tivendale et al, 2014).

El mutante insercional *Lfs2448* exhibe esterilidad gametofítica masculina y menor tasa de cuajado. El T-DNA responsable del fenotipo mutante se ha localizado en la región intergénica que separa dos genes que codifican proteínas CYP450. La inserción de este T-DNA podría haber alterado la función de uno o de los dos genes *CYP450*. El análisis *in silico* indicó que estos genes se expresan mayoritariamente en botones florales y en frutos de 1 cm de calibre. Por tanto, no se puede descartar que la alteración que promueve la mutación *Lfs2448* modifique la síntesis de giberelinas y/o auxinas, dos fitohormonas estrechamente relacionadas con el proceso de cuajado. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren firmemente que la mutación *Lfs2448* desempeña un relevante papel en el desarrollo reproductivo de tomate.

5.6. La mutación *Alq* tiene efectos sobre el crecimiento vegetativo

En el mutante *Arlequín* (*Alq*) se ha producido la inserción de un T-DNA truncado en la secuencia reguladora del gen MADS-box *ARLEQUÍN-TAGL1* (*ALQ*) promoviendo la expresión ectópica y un mayor nivel de transcripción de dicho gen. Como consecuencia, los sépalos de las flores cambian su programa de desarrollo y se convierten en órganos análogos a un fruto. Se había visto que los cambios más significativos que se producen en el cáliz se detectan con claridad

en etapas de post-antesis, es decir, a partir del cuajado del fruto (Antón, 2012), aunque los análisis de microscopía electrónica de barrido indicaban que el primer verticilo floral exhibía profundas alteraciones homeóticas en el estadio de antesis (Pineda et al, 2010). La caracterización de los patrones del desarrollo vegetativo que conducen a la formación de hojas, crecimiento simpodial y transición floral eran idénticos a los del WT. En este sentido, no existían diferencias en el número de fitómeros y la longitud desde la base de la planta hasta cada una de las siete primeras inflorescencias entre plantas WT y *Alq* (Pineda et al, 2010). Sin embargo, a lo largo de diferentes campañas se había observado que *Alq* exhibía un patrón de crecimiento vegetativo más vigoroso. Los diferentes experimentos realizados en el contexto de esta Tesis Doctoral parecen indicar que, durante un corto periodo de tiempo, coincidente con las primeras etapas del estadio de plántula, el crecimiento de las plantas *Alq* es más lento que el que exhiben las plantas WT. Este comportamiento se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* (ver figura 41A a los 4 días, tabla 11 a los 7 días, o figura 44A). Sin embargo, una vez superado este periodo, las plantas *Alq* experimentan un crecimiento más vigoroso que las WT (ver figura 41A a partir de los 4 días).

Uno de los efectos de la expresión ectópica de *ALQ* en el mutante es la alteración de la zona de abscisión del fruto. En tomate, la zona de abscisión del fruto se encuentra localizada en el punto medio del pedicelo (Roberts et al, 1984). La función de *JOINTLESS* (*J*), un gen de tipo MADS-box, es necesaria para que se produzca la abscisión del fruto con normalidad, lo que no ocurre en el mutante *jointless* (Mao et al, 2000). De forma similar a lo que sucede en este mutante y en algunas líneas de anulación de función de *JOINTLESS* (*J*), la zona de abscisión del fruto se encuentra suprimida en *Alq* (Pineda et al, 2010), lo que sugiere que el gen *ALQ* regula la actividad de *J* durante el desarrollo del sépalo. Por otro lado, *MACROCALYX* (*MC*), un gen MADS box requerido para mantener la identidad del sépalo y que pertenece a la subfamilia *APETALA1/FRUITFUL* (*AP1/FUL*), también controla el desarrollo de la zona de abscisión del pedicelo formando heterodímeros con *J*. Al igual que ocurre con *J*, la expresión de *MC* es muy baja en plantas que expresan ectópicamente *ALQ* (Giménez et al, 2010). Genes implicados en el mantenimiento del meristemo apical y en el inicio de los meristemas axilares se encuentran regulados por *J* y *MC* en la zona de abscisión del pedicelo. Es lo que ocurre con *WUSCHEL* (*SIWUS*), un factor de transcripción que regula el mantenimiento de la población de células madre los meristemas, *LATERAL SUPPRESSOR* (*LS*), un miembro de la familia VHIID que controla el

desarrollo de meristemas laterales y *Blind (Bl)*, que pertenece a la clase R2R3 de los genes *Myb* y controla, a través de una ruta distinta a la de *LS*, el desarrollo de meristemas laterales. Se ha comprobado que *SIWUS*, *LS* y *Bl* experimentan una severa reducción de sus niveles de expresión en pedicelos que no desarrollan zona de abscisión (Nakano et al, 2012). Más recientemente se ha descubierto que el gen MADS box tipo *SEPALLATA (SP) SLMBP21* también está implicado en la formación de la zona de abscisión del pedicelo de tomate a través de interacciones con *J* y *MC* (Liu et al, 2014). *SLMBP21* pertenece al subgrupo *Floral Binding Protein9/23 (FBP9/23)* que no se encuentra presente en *Arabidopsis*. Vandebussche et al (2003) reportaron que la inhibición de la expresión de *FBP9* en petunia alteraba la arquitectura de las plantas. Por tanto, no se puede descartar que la diferente arquitectura vegetativa de *Alq* se deba a una alteración en los niveles de transcrito de algunos de los genes mencionados anteriormente (i.e. *SIWUS*, *LS*, *Bl* o *SLMBP21*). De hecho y por lo que respecta al desarrollo de brotes laterales, la población original a partir de la cual se obtuvo el mutante *Alq* (i.e. LP2) tiene un crecimiento semideterminado y desarrolla vigorosos brotes laterales desde los primeros estadios, retrasando el crecimiento de la planta en altura. El desarrollo de estos brotes laterales no es tan evidente en el mutante *Alq* que parece comportarse más bien como una línea de crecimiento indeterminado.

5.7. La mutación *Alq* promueve cambios en la configuración espacial del sistema radicular

La caracterización que hemos realizado *in vitro* ha revelado cambios en la configuración espacial del desarrollo radicular de *Alq*. En este sentido, los experimentos realizados parecen indicar que *Alq* desarrolla raíces laterales de mayor longitud. Los injertos realizados entre el WT y el mutante han indicado que el mayor vigor de *Alq* no parece estar relacionado con las alteraciones observadas en el sistema radicular. Sin embargo, la nueva arquitectura radicular de *Alq* le podría proporcionar un mejor comportamiento bajo ciertas condiciones de estrés. Los experimentos realizados en condiciones de estrés osmótico *in vitro* han evidenciado la mayor tolerancia de *Alq*. En estas condiciones, el mutante desarrolló más hojas que el WT y raíces de mayor longitud.

Se ha postulado que la auxina regula la producción de raíces laterales antes del inicio de su desarrollo, actuando sobre células del periciclo para que se conviertan en fundadoras y generando lo que podría denominarse como “regiones de pre-ramificación radicular” o “primordios de raíces laterales”. Sin embargo,

Moreno-Risueno et al (2010) demostraron que la auxina por sí sola no es suficiente para generar estas regiones de pre-ramificación radicular. El análisis de un mapa transcripcional espaciotemporal de la raíz de *Arabidopsis* (RootMap) permitió identificar una serie de factores de transcripción de la familia de proteínas MADS-box cuya implicación en el desarrollo radicular no había sido descrita anteriormente. Entre estos factores de transcripción se encontraban *SHATTERPROOF1* (*SHP1*) y *SHP2*, implicados en el desarrollo de los óvulos y carpelos, y en la diseminación de la semilla. El análisis de los dobles mutantes *shp1 shp2* mostró un sorprendente fenotipo radicular caracterizado por una reducción sustancial del número de raíces laterales y de regiones de pre-ramificación radicular. Utilizando un delator transcripcional (luciferasa) encontraron que la expresión conferida por el promotor de *SHP1* se detectaba en las regiones de pre-ramificación radicular. Moreno-Risueno et al (2010) concluyeron que *SHP1* y *SHP2* actúan junto con el gen *AUXIN RESPONSIVE FACTOR7* (*ARF7*) en una misma ruta para producir periódicamente regiones de pre-ramificación radicular. El gen *ALQ/TAGL1* es el ortólogo en tomate de los genes *SPH* de *Arabidopsis*. Los análisis de expresión revelaron que el gen *ALQ/TAGL1* se encontraba ectópicamente sobre-expresado en diferentes tejidos del mutante (Giménez et al, 2010). Así, en la raíz de *Alq* se detectó una acumulación significativa de los niveles de transcrito de *ALQ/TAGL1*. Por consiguiente, es muy posible que el incremento de expresión de *ALQ/TAGL1* en la raíz sea el promotor de los cambios en la configuración espacial del desarrollo radicular observados en el mutante.

5.8. La mutación *Alq* conduce a un mayor cuajado de fruto

Los datos previos sugerían que la expresión ectópica de *ALQ/TAGL1* podría incrementar la tasa de cuajado de fruto en el mutante *Alq*. Por ejemplo, los cálices son capaces de convertirse en órganos análogos a un fruto en ausencia de polinización, adquirir todas las características de un sumidero y madurar como un fruto normal (Pineda et al, 2010). Por otro lado, los patrones espaciales y temporales de expresión del *ALQ/TAGL1* en flores y frutos de plantas WT de tomate indican un patrón de inducción bifásico. La expresión de este gen se inicia en estadios muy tempranos del desarrollo floral aunque la mayor acumulación de transcritos se detecta en flores en estadio de antesis (Giménez et al, 2010), es decir, en el estadio en el que se produce la polinización de la flor y el cuajado del fruto. A lo largo del desarrollo del fruto, *ALQ/TAGL1* experimenta un nuevo pico

de expresión coincidiendo con la etapa de maduración del fruto. El papel esencial que *ALQ/TAGL1* desempeña como regulador del proceso de maduración del fruto ha sido ampliamente demostrado (Vrebalov et al, 2009, Itkin et al, 2009, Giménez et al, 2010). Pero además, y a diferencia de lo que ocurre con otros genes implicados en el proceso de maduración (i.e. *rin* o *Cnr*), se ha sugerido que *ALQ/TAGL1* también actúa en el desarrollo temprano del carpelo, coincidiendo con el estadio de proliferación celular del carpelo que tiene lugar en la etapa posterior a la antesis (Giovannoni et al, 2017). Busi et al (2003) señalaron que *ALQ/TAGL1* tenía que ser un gen importante para el cuajado del fruto de tomate ya que se inducía en las paredes del ovario justo después de la antesis. De hecho, la sobre-expresión de *ALQ/TAGL1* en tomate es capaz de promover cuajado de fruto a partir del ovario en ausencia de polinización (Vrebalov et al, 2009). Estos resultados también se han visto al sobre-expresar en tomate el gen *PpPLENA*, el ortólogo de *ALQ/TAGL1* en melocotón (Tadiello et al, 2009). En definitiva, el gen *ALQ/TAGL1* podría emerger como un nuevo actor en el proceso de cuajado de fruto en tomate.

5.8.1. La mayor tasa de cuajado se debe a un cuajado prematuro del fruto

La caracterización del desarrollo reproductivo reveló que la mutación *Alq* promueve el desarrollo prematuro del fruto, es decir, previo a la antesis, y un significativo incremento de la tasa de cuajado de fruto. Además, la mayor parte de los frutos que cuajan en el mutante *Alq* carecen de semilla. La ausencia de polen fértil podría contribuir al desarrollo prematuro del fruto y, por ende, a la partenocarpia (Mazzucato et al, 1993; Rojas-Gracia et al, 2017). Sin embargo, los ensayos de viabilidad de polen que se realizaron tanto *in vitro* como *in vivo* indicaron que el cuajado prematuro del fruto no estaba relacionado con una menor fertilidad del polen, unos resultados que ya habían sido previamente observados en el grupo (Pineda et al, 2010). Un aspecto a destacar es el desarrollo de rudimentos seminales (también denominados en la literatura como estructuras tipo semilla o pseudo-embriones) en la mayor parte de los frutos partenocárpicos de *Alq*. Este tipo de estructuras aparecen frecuentemente en frutos inducidos mediante tratamientos con auxina (Asahira et al, 1967; Kataoka et al, 2003), y también se han encontrado en cápsulas partenocárpicas de plantas transgénicas de tabaco que expresan de forma específica en óvulos un gen implicado en la biosíntesis de auxina (Rotino et al, 1997; Carmi et al, 2003). También se han obtenido frutos partenocárpicos con pseudo-embriones en

plantas transgénicas de tomate que expresaban formas aberrantes de *ARF8*, un gen que se expresa en óvulos (Goetz et al, 2007). En óvulos de flores WT de tomate en el estadio 9 (i.e. botones florales de 3 mm, Brukhin et al, 2003) se han detectado elevados niveles de transcrito del gen *ALQ/TAGL1* (Vrebalov et al, 2009; Giménez et al, 2010). No es descartable, por tanto, que los pseudoembriones observados en *Alq* se generen como consecuencia de la sobreexpresión ectópica del gen *ALQ/TAGL1* en los frutos no polinizados. Respecto al cuajado de fruto, varios autores han propuesto que estos pseudoembriones pueden producir hormonas y estimular el crecimiento prematuro del ovario (Kataoka et al, 2003, Goetz et al, 2007, de Jong et al, 2009).

Como se comentaba anteriormente, la mayor parte de los frutos que cuajan en el mutante *Alq* son partenocárpicos. La partenocarpia se ha asociado a una mayor calidad del fruto en términos de mayor contenido en sólidos solubles (Falavigna et al, 1978; Casas Diaz et al, 1987; Ficcadenti et al, 1999; Carmi et al, 2003; Mazzucato et al, 2015; Klap et al, 2016). Según Pineda et al (2010), los frutos del mutante *Alq*, tanto los derivados del ovario como los que proceden del cáliz, poseen mayor calidad nutricional, ya que tienen niveles significativamente mayores de azúcares, licopeno y sólidos solubles que los frutos WT.

5.8.2. El cuajado prematuro del fruto parece estar relacionado con la mayor expresión de genes implicados en el ciclo celular

Nuestros resultados muestran que los ovarios en antesis del mutante *Alq* son de mayor calibre. El mayor calibre de los ovarios se debe a un mayor espesor del pericarpo, consecuencia de un incremento en el número de capas celulares. El desarrollo del fruto de tomate se caracteriza por exhibir una tasa de división celular intensa tras el cuajado del fruto. La elevada tasa de división celular que se induce tras la fertilización es consecuencia del incremento de expresión de ciclinas (*Cyc*) y ciclinas dependientes de quinasas (*CDKs*). Según Joubès et al (1999), el cuajado de fruto implica la generación de señales que conducen a la reactivación del ciclo celular permitiendo el crecimiento del fruto mediante divisiones celulares. Las auxinas y giberelinas podrían ser las señales responsables de inducir la expresión de los genes implicados en el ciclo celular (Joubès et al, 1999; Vriezen et al, 2008). Los análisis de expresión realizados en *Alq* revelaron cambios importantes en los niveles de transcrito de varios genes implicados en división celular, metabolismo de las giberelinas y señalización de la auxina. En ovarios de tomate, los transcritos del gen *CDKA1* se acumulan

típicamente después del estadio de antesis (Joubès et al, 1999). En los ovarios de *Alq* se detectaron niveles de expresión del gen *CDKA1* significativamente mayores ya en el estadio de antesis, lo que indicaría que el cuajado se ha producido antes de la antesis. Este cuajado prematuro del fruto podría también estar relacionado con el mayor nivel de expresión de genes implicados en la biosíntesis de giberelinas (i.e. *SIGA3ox1* y *SIGA3ox2*) detectado en ovarios de *Alq* en estadio de pre-antesis. Algunos de los componentes de la ruta de señalización de auxinas regulan el inicio del desarrollo del fruto. Por ejemplo, *SIARF8*, uno de los miembros de la familia *AUXIN RESPONSIVE FACTOR (ARF)*, puede estimular la expresión de genes de respuesta a auxina, lo que promovería el inicio del crecimiento del fruto (Goetz et al, 2007). De hecho, las plantas transgénicas que tienen silenciado el gen *SIIAA9* exhiben cuajado prematuro de fruto y mayor expresión del gen *SIARF8* en estadio de pre-antesis (Wang et al, 2005, 2009). Nosotros detectamos mayores niveles de expresión del gen *SIARF8* en ovarios *Alq* en los estadios de pre-antesis y antesis, aunque no detectamos diferencias en la expresión de *SIIAA9*. *SIWUS*, un miembro de la familia de factores de transcripción específicos de plantas WUS homebox (WOX) (Muños et al, 2009), está implicado en la regulación del desarrollo del fruto mediante el control de la división celular (Azzi et al, 2015). Los niveles de expresión de *SIWUS* fueron significativamente mayores en los ovarios de *Alq* en todos los estadios del desarrollo floral evaluados. Según Azzi et al (2015), el gen *ALQ/TAGL1* está implicado en la regulación del desarrollo del fruto a través del control de la división celular. Nuestros resultados demuestran que el mayor nivel de expresión de *ALQ/TAGL1* en el mutante *Alq* promueve crecimiento del ovario independiente de polinización y altera los niveles de transcrito tanto de genes implicados en división celular como de otros reguladores comprometidos con el cuajado del fruto de tomate.

5.8.3. La mayor concentración endógena de citoquininas en los ovarios conduce a un cuajado prematuro del fruto en el mutante *Alq*

Además de las giberelinas y las auxinas, el ácido abscísico y las citoquininas participan en el inicio del desarrollo del fruto (Mariotti et al, 2011). Mientras que los niveles de auxinas, giberelinas y citoquininas aumentan durante el cuajado de los frutos, los niveles de ácido abscísico disminuyen (Mariotti et al, 2011; McAtee et al, 2013; Kumar et al, 2014). De hecho, la aplicación exógena de auxinas, giberelinas o citoquininas en ovarios de tomate desencadena el desarrollo del

fruto en ausencia de polinización y fertilización (Martí et al, 2007; Serrani et al, 2007; Matsuo et al, 2012). Según Ding et al (2013), la aplicación exógena de citoquinina promueve el desarrollo de frutos partenocárpicos a través de la modulación del metabolismo de las auxinas y giberelinas. Marsch-Martínez et al (2012) demostraron que los factores de transcripción *SHATTERPROOF1/2* (*SHP1/2*), los ortólogos de *Arabidopsis* del gen *ALQ*, son necesarios para la acumulación de citoquininas durante el desarrollo del gineceo y del fruto y promueven la activación de *GA3ox1* a través del gen *INDEHISCENT* (*IND*). Los resultados del análisis de fitohormonas endógenas reflejaron la mayor acumulación de GA_1 en la etapa de antesis y una concentración más baja de ABA a los 5 y 2 días antes de la antesis en los ovarios de *Alq*. En consonancia con los resultados descritos en *Arabidopsis* en relación con los genes *SHP*, el mutante *Alq* exhibió un nivel de expresión significativamente mayor de genes *GA3ox* (*GA3ox1* y *GA3ox2*) en el estadio de pre-antesis (ver apartado 5.8.2), lo que podría explicar la mayor concentración de GA_1 en el estadio de antesis. Además, los ovarios del mutante *Alq* experimentan una mayor acumulación de varias citoquininas en diferentes estadios del desarrollo floral. Los mayores niveles endógenos de citoquinina y giberelina (GA_1) y la menor concentración de ABA, posiblemente debida a la interacción antagonista entre citoquininas y ABA (Dodd, 2003), explican en gran medida el crecimiento prematuro del ovario y el desarrollo de frutos sin semilla en el mutante *Alq*.

5.8.4. El cuajado de fruto es menor en plantas que tienen silenciado el gen ALQ

Nosotros hemos observado que las plantas con el gen *ALQ* silenciado tienen menor tasa de cuajado y, por ende, producción de fruto. Según Wang et al (2005), uno de los eventos clave en el proceso de cuajado de fruto es la reducción de la expresión de los genes *TAG1* y *TAG6*. Los niveles transcripcionales de *TAG1* se reprimen notablemente en las líneas que sobre-expresan *ALQ* y se inducen en las que *ALQ* está silenciado, indicando que existen mecanismos compensatorios de la expresión génica entre esos dos genes parálogos (Giménez et al, 2010). Así, esta interacción entre *TAG1* y *ALQ* podría explicar la menor tasa de cuajado de las plantas con el gen *ALQ* silenciado. Además, a la inversa de lo que se ha observado en el mutante *Alq*, en las plantas con el gen *ALQ* silenciado disminuye el nivel de expresión de genes implicados en el ciclo celular (Giménez et al, 2016). Como se comentaba anteriormente, la generación de señales junto con la

reactivación del ciclo celular permiten que el ovario reanude el crecimiento a través de divisiones celulares (Joubès et al, 1999). Por tanto, el gen *ALQ* podría actuar como un integrador de las señales que desencadenan el crecimiento del ovario durante el cuajado del fruto.

5.9. El mutante *Alq* mantiene la producción de fruto en condiciones de moderada salinidad

La capacidad del mutante *Alq* para incrementar la tasa de cuajado de fruto podría tener un enorme interés en condiciones restrictivas (i.e. estrés salino). Para contrastarlo, nosotros realizamos una evaluación de la tasa de cuajado y la producción en plantas WT y *Alq* bajo condiciones de moderada salinidad. Según Cuartero y Muñoz (1999), en condiciones de moderada salinidad (i.e. CE = 2,5 dS m⁻¹) la menor producción de fruto se debe principalmente a la reducción del peso medio de fruto. Nosotros hemos comprobado que el tratamiento salino afectó de forma más severa al peso de los frutos WT que al peso de los del mutante. En efecto, en condiciones salinas el peso medio de los frutos del WT disminuyó casi un 40% mientras que en los frutos de *Alq* esta disminución sólo fue del 30%. Además, observamos que en las plantas WT sometidas al estrés salino disminuía significativamente el porcentaje de frutos de gran calibre mientras que con los de pequeño calibre ocurría justamente lo contrario. En *Alq* sin embargo, los porcentajes de frutos de gran calibre y de pequeño calibre eran similares en ambas condiciones (control y estrés salino).

Al igual que se vio en el primer experimento que realizamos para evaluar la tasa de cuajado, en condiciones no salinas se produjo el cuajado de fruto en la mayoría de las flores del mutante *Alq*, mientras que en el WT, sólo en 1 de cada 4 flores se produjo el cuajado. Lo más interesante fue que el tratamiento salino no redujo el número de frutos cuajados en las plantas *Alq*, mientras que en las plantas WT cuajaron significativamente menos frutos. En ambas condiciones de cultivo (sin y con sal), la mayor tasa de cuajado del mutante *Alq* pudo verse favorecida por la inhibición de la zona de abscisión del pedicelo. Según Cuartero y Muñoz (1999), la inhibición de la abscisión del fruto podría evitar la caída de frutos en desarrollo que a menudo se observa en condiciones salinas.

Por otro lado, se ha sugerido que las citoquininas podrían desempeñar un papel integral en las respuestas bajo condiciones de estrés a través de interacciones con otras fitohormonas (revisado por Zalabák et al, 2013). Además, se ha demostrado que la modulación de genes implicados en la ruta de

biosíntesis de citoquininas promueve una mejor respuesta de las plantas frente al estrés, lo que sugiere que la citoquinina endógena puede conferir tolerancia (revisado por Wani et al, 2016). Por tanto, aunque la mayor concentración de citoquininas en el mutante *Alq* se puede asociar al desarrollo temprano de la fruta, no se puede descartar que también promueva mayor tolerancia a la salinidad.

El mantenimiento de la productividad agrícola bajo condiciones de estrés desfavorable es un objetivo importante para satisfacer la creciente demanda de alimentos a través de una agricultura sostenible (Cuartero et al, 2010; Pineda et al, 2012). Recientemente, Klap et al (2016) reportaron que la pérdida de función de *SIAGL6* aumenta el cuajado de fruto independiente de polinización, lo que asegura la producción bajo unas condiciones de estrés por altas temperaturas que son limitantes para el desarrollo de polen fértil. En este trabajo, nosotros hemos demostrado que las plantas *Alq* son capaces de mantener la producción en condiciones de moderada salinidad (i.e. 50 mM de NaCl) sobre la base de una mayor tasa de cuajado de fruto. En estas condiciones y sólo teniendo en cuenta el cuajado de fruto derivado del ovario, las plantas *Alq* exhibieron un 59% más de cuajado y un 39% más de producción de fruto que las WT. *Alq* experimentó un 74% más de cuajado y un 75% más de producción cuando además se tuvo en cuenta el cuajado de fruto derivado del cáliz.

En conjunto, nuestros resultados revelan que la expresión ectópica de *ALQ* en el mutante promueve cuajado prematuro del fruto. Como consecuencia, el mutante *Alq* exhibe mayor tasa de cuajado de fruto que el WT. Lo más interesante es que la mayor tasa de cuajado permite el mantenimiento de la producción de fruto en condiciones de moderada salinidad.

6. Conclusiones

1. Los mutantes *Lfs2084* y *Lfs2448* exhiben menor tasa de cuajado de fruto y presentan un patrón de herencia autosómica dominante. Ambas mutaciones, de naturaleza insercional, ocasionan letalidad del gameto masculino y alteran los procesos de polinización y cuajado del fruto.
2. La mutación *Lfs2084* provoca la degeneración de los granos de polen durante la fase de microgametogénesis, y además parece afectar a la receptividad del ovario perturbando la germinación de los granos de polen y la progresión de los tubos polínicos a lo largo del estilo. Como consecuencia, la tasa de cuajado de fruto del mutante *Lfs2084* disminuye en casi un 85% con respecto al WT.
3. La mutación *Lfs2084* comporta cambios en la biosíntesis de carotenoides y fitohormonas endógenas que se reflejan en diferentes caracteres fenotípicos que expresa el mutante, como la pigmentación de hojas y pétalos, y la densidad de tricomas. La menor acumulación de la giberelina bioactiva involucrada en el desarrollo temprano del fruto (i.e. GA₁) y la alteración de los perfiles de expresión de diferentes genes implicados en la transición de ovario a fruto son coherentes con el fenotipo de menor tasa de cuajado observado en el mutante.
4. La mutación *Lfs2448*, que reduce en un 50% la tasa de cuajado de fruto, se localiza en la región intergénica de dos genes que codifican proteínas citocromo P450 y que se expresan mayoritariamente en botones florales y frutos de 1 cm. En conjunto, estos resultados sugieren la identificación de

nuevos reguladores que desempeñan un papel relevante en el inicio del desarrollo del fruto de tomate.

5. La mutación *Alq* confiere una mayor tasa de crecimiento vegetativo, así como cambios en la arquitectura radicular relacionados con el desarrollo de raíces laterales de mayor longitud. Los cambios en la configuración espacial del desarrollo radicular no son responsables de la mayor tasa de crecimiento vegetativo, pero la alteración de ambos caracteres permite que el mutante *Alq* tolere mejor una situación de estrés osmótico en condiciones de cultivo *in vitro*.
6. La mutación *Alq* conduce a una mayor tasa de cuajado de fruto como consecuencia de un desarrollo prematuro del ovario. Los cambios en el patrón de expresión de genes implicados en el ciclo celular y en la regulación de las señales hormonales que promueven el desarrollo inicial del fruto sugieren que el gen *ALQ* podría actuar como un integrador de las señales que desencadenan el crecimiento del ovario durante el proceso de cuajado.
7. La tasa de cuajado de fruto de *Alq* no se ve penalizada bajo condiciones de moderada salinidad, lo que permite que las plantas mutantes sean capaces de mantener la producción cuando son sometidas a estos tratamientos de estrés salino.

7. Bibliografía

- Abdel-Aal el-SM, Akhtar H, Zaheer K, Ali R** (2013). Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients* 5(4), 1169-85.
- 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.
- Alonso-Peral MM, Li J, Li Y, Allen RS, Schnippenkoetter W, Ohms S, White RG, Millar AA** (2010). The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 154: 757-771.
- 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 Physiology* 130: 1-13.
- Angenent GC, Franken J, Busscher M, van Dijken A, van Went JL, Dons HJM and van Tunen AJ** (1995). A novel class of MADS box genes is involved in ovule development in petunia. *Plant Cell.* 7: 1569-1582.
- Antón T** (2012). La caracterización del mutante insercional *Arlequín* revela que el gen etiquetado tiene un papel clave en el desarrollo reproductivo de tomate. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Ariizumi T, Shinozaki Y, Ezura H** (2013). Genes that influence yield in tomato. *Breeding Science*, 63: 3-13.
- Asahira T, Takeda Y, Nishio T, Hirabayashi M and Tsukamoto Y** (1967). Studies on fruit development in tomato. I. Ovule development and content of diffusible auxin in synthetic auxin- and gibberellin-induced parthenocarpic tomato fruits in relation to their development. *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.* 28: 47–74.
- Aya K, Ueguchi-Tanaka M, Kondo M, Hamada K, Yano K, Nishimura M, Matsuoka M** (2009). Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of GAMYB. *The Plant Cell* 21:1453-1472.

- Azzi L, Deluche C, Gévaudant F, Frangne N, Delmas F, Hernould M, Chevalier C** (2015). Fruit growth-related genes in tomato. *Journal of Experimental Botany* 66(4), 1075-1086.
- Barry CS and Giovannoni JJ** (2006). Ripening in the tomato green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 103:7923–28.
- Barry CS, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton AJ and Grierson D** (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant Journal*. 9:525–35
- Bartley GE and Ishida BK** (2003). Developmental gene regulation during tomato fruit ripening and *in-vitro* sepal morphogenesis. *BMC Plant Biology*, 3.
- Bartrina I, Otto E, Strnad M, Werner T, Schmulling T** (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 23: 69-80.
- Bassel GW, Mullen RT, Bewley JD** (2008). *procera* is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *Journal of Experimental Botany*, 59: 585-593.
- Bassel GW, Zielinska E, Mullen RT, Bewley JD** (2004). Downregulation of DELLA genes is not essential for germination of tomato, soybean, and *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology*, 136: 2782-2789.
- Berger F, Twell D** (2011). Germline specification and function in plants. *Annual Review Plant Biology*, 62: 461-484.
- Bergervo JHW, Verhoeven HA, Gilissen LJW, Bino RJ** (1996). High amounts of nuclear DNA in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pericarp. *Plant Science*, 116: 141-145.
- Biancucci M, Mattioli R, Fortani G, Funk D, Costantino P, Trovato M** (2015). Role of proline and BABA in sexual reproduction of angiosperms. *Frontiers in Plant Science* 6: 680.
- Bishop GJ, Harrison K and Jones JDG** (1996). The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new Cytochrome P450 family. *The Plant Cell* 8:959-969
- Blumenfeld A and Gazit S** (1970). Cytokinin activity in avocado seeds during fruit development. *Plant Physiology*, 46: 331-333. □
- Bohner J, Bangerth F** (1988). Cell number, cell size and hormone levels in semi-isogenic mutants of *Lycopersicon pimpinellifolium* differing in fruit size. *Physiologia Plantarum*, 72: 316-320.
- Bohner J, Hedden P, Borahaber E, Bangerth F** (1988). Identification and quantitation of gibberellins in fruits of *Lycopersicon esculentum*, and their relationship to fruit size in *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Physiologia Plantarum*, 73: 348–353.

- Bolduc N and Hake S** (2009). The maize transcription factor KNOTTED1 directly regulates the gibberellin catabolism gene *ga2ox1*. 21(6) 1647-58.
- Borg M, Brownfield L, Twell D** (2009). Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of Experimental Botany* 60(5), 1465-78.
- Bowman JL, Smyth DR and Meyerowitz EM** (2012). The ABC model of flower development: then and now. *Development* 139, 4095-4098.
- Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK** (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126: 524-535.
- Brukhin V, Hernould M, Gonzalez N, Chevalier C and Mouras A** (2003). Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry. *Sexual Plant Reproduction* 15: 311–320.
- Bungerkibler S and Bangerth F** (1983). Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regulation*, 1: 143-154.
- Burssens S, Van Montagu M, Inze D** (1998). The cell cycle in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 36: 9-19.
- 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 Molecular Biology*. 52: 801-815.
- Cara B and Giovannoni JJ** (2008). Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science* 175: 106–113.
- Carmi N, Salts Y, Dedicova B, Shabtai S, Barg R** (2003). Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary. *Planta*, 217: 726–735.
- Carrera E, Ruiz-Rivero O, Peres L.E, Atares A, Garcia-Martinez JL** (2012). Characterization of the *procera* tomato mutant shows novel functions of the SIDEELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. *Plant Physiology*, 160: 1581–1596.
- Caryl AP, Jones GH and Franklin FC** (2003). Dissecting plant meiosis using *Arabidopsis thaliana* mutants. *Journal of Experimental Botany* 54(380), 25-38.
- Casas-Diaz AV, Hewitt JD, Lapushner D** (1987). Effects of parthenocarpy on fruit quality in tomato. *J. Am. Soc. Hort. Sci* 112: 634-637.
- Causier B, Schwarz-Sommer Z and Davies B** (2010). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21, 73-79.
- Chakrabarti M, Zhang N, Sauvage C, Muños S, Blanca J, Cañizares J, Diez MJ, Schneider R, Mazourek M, McClead J, Causse M and van der Knaap E** (2013).

- A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *PNAS* 110(42) 17125-130.
- Chamarro J** (1995). Anatomía y fisiología de la planta. En: Nuez F. (ed.) *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundo Prensa, Madrid. pp. 44-91.
- Chandra Sekhar KN and Sawhney VK** (1991). Role of ABA in stamen and pistil development in the normal and solanifolia mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Sexual Plant Reproduction* 4: 279-283.
- Chang H, Jones ML, Banowitz GM, Clark DG** (2003). Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with PSAG12-*IPT* delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. *Plant Physiology*, 132: 2174–2183.
- Chapman GP** (1987). The tapetum. *International Review of Cytology – A Survey of Cell Biology*, 107: 111-125.
- Chaudhury A, Letham S, Craig S and Dennis E** (1993). *amp1*- a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *The Plant Journal* 4(6), 907-916.
- Cheng H, Qin L, Lee S, Fu X, Richards DE, Cao D, Luo D, Harberd NP, Peng J** (2004). Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *The Company of Biologists* 131(5), 1055-1064.
- Chung M, Vrebalov J, Alba R, Lee J, McQuinn R, Chung JD, Klein P and Giovannoni J** (2010). A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SIAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *Plant Journal* 64:936-47.
- Cížková M, Pichová A, Vítová M, Hlavová M, Hendrychová J, Umysová D, Gálová A, Sevcovicova E, Zachleder V, Bisová K** (2008). CDKA and CDKB kinases from *Chlamydomonas reinhardtii* are able to complement *cdc28* temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma* 232, 183-191.
- Coen ES and Meyerowitz EM** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31-37.
- Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons HJ, Angenent GC and van Tunen AJ** (1995). The petunia MADS box gene *FBP11* determines ovule identity. *The Plant Cell* 7, 1859-1868.
- Cuartero J and Fernández-Muñoz R** (1999). Tomato and salinity: a review. *Scientia Horticulturae* 78: 83-125.
- Czerednik A, Busscher M, Angenent GC, de Maagd RA** (2015). The cell size distribution of tomato fruit can be changed by overexpression of CDKA1. *Plant Biotechnology Journal* 13 (2): 259-268.
- Czerednik A, Busscher M, Bielen BAM, Wolters-Arts M, de Maagd RA, Angenent GC** (2012). Regulation of tomato fruit pericarp development by an interplay between CDKB and CDKA1 cell cycle genes. *Journal of Experimental Botany* 63: 2605-2617.

- da silva EM, Ferreira e Silva GF, Bidioa DB, Azevedo MS, de Jesus FA, Pino LE, Peres LE, Carrera E, López-Díaz I, Nogueira FT (2017). microRNA159-targeted *SIGAMYB* transcription factors are required for fruit set in tomato. *The Plant Journal* 92, 95-109.
- David-Schwartz R, Weintraub L, Vidavski R, Zemach H, Murakhovsky L, Swartzberg D, Granot D (2013). The *SIFRK4* promoter is active only during late stages of pollen and anther development. *Plant Science*, 199-200: 61-70.
- Davidson SE, Reid JB, Helliwell CA (2006). Cytochromes P450 in gibberellin biosynthesis. *Phytochem rev* 5:405-419.
- de Jong M, Mariani C, Vriezen WH (2009a). The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1523-1532.
- de Jong M, Wolters-Arts M, Feron R, Mariani C, Vriezen WH (2009b). The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SIARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *Plant Journal*, 57: 160-170.
- de Jong M, Wolters-Arts M, Garcia-Martinez J.L, Mariani C, Vriezen WH (2011). The *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (SIARF7) mediates cross-talk between auxin and gibberellin signalling during tomato fruit set and development. *Journal of Experimental Botany*, 62: 617-626.
- de Martino G, Pan I, Emmanuel E, Levy A and Irish VF (2006). Functional analyses of two tomato APETALA3 genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *Plant Cell*. 18: 1833–1845.
- De Storme N, Geelen D (2013). Pre-meiotic endomitosis in the cytokinesis-defective tomato mutant *pmcd1* generates tetraploide meiocytes and diploid gametes. *Journal of Experimental Botany*, 64: 2345-2358.
- Devoghalaere F, Doucen T, Guitton B, Keeling J, Payne W, Ling TJ, Ross JJ, Hallett IC, Gunaseelan K, Dayatilake GA, Diak R, Breen KC, Tustin DS, Costes E, Chagné D, Schaffer RJ, David KM (2012). A genomics approach to understanding the role of auxin in apple (*Malus × domestica*) fruit size control. *BMC Plant Biology*, 12: 7.
- Dielen V, Marc D and Kinet JM (1998). Flowering in the *uniflora* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): description of the reproductive structure and manipulation of flowering time. *Plant Growth Regulation* 25, 149-157.
- Dielen V, Quinet M, Chao J, Batoko H, Havelange A and Kinet JM. (2004). *UNIFLORA*, a pivotal gene that regulates floral transition and meristem identity in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *New Phytologist* 161, 393-400.
- Ding J, Chen B, Xia X, Mao W, Shi K, Zhoy Y, Yu J (2013). Cytokinin-induced parthenocarpic fruit development in tomato is partly dependent on enhanced gibberellin and auxin biosynthesis. *Plos One* 8(7):e70080

- Ding L, Yan S, Jiang L, Zhao W, Ning K, Zhao J, Liu X, Zhang J, Wang Q and Zhang X** (2015). *HANABA TARANU (HAN)* bridges meristem and organ primordia boundaries through *PINHEAD*, *JAGGED*, *BLADEP ONPPETIOLE2* and *CYTOKININ OXIDASE 3* during flower development in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 11, e1005479.
- Ditta G, Pinyopich A, Robles P, Pelaz S and Yanofsky MF** (2004). The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 1935-1940.
- Dodd IC, Tan LP, He J** (2003). Do increases in xylem sap pH and/or ABA concentration mediate stomatal closure following nitrate deprivation?. *Journal of Experimental Botany* 54(385):1281-8.
- Dumas C, Rogowsky P** (2008). Fertilization and early seed formation. *C R Biol.* 331 (10): 715-25.
- Durst F and Benveniste I** (1993). Cytochrome P450 in plants. Part of the Handbook of Experimental Pharmacology 150, 293-310.
- Echlin P** (1971). Production of sporopollenin by the tapetum. En: Brooks J, Grant P.R, Muir M, van Gijzel P, Shaw G. (eds.) *Sporopollenin*. Ediciones Academic Press, London. pp. 220-247.
- Evans MMS and Barton, MK** (1997). Genetics of angiosperm shoot apical meristem development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 673-701.
- Falavigna A, Badino M, Soressi GP** (1978). Potential of the mono Mendelian factor pat in the tomato breeding industry. *Genetica Agraria* 32: 156-160.
- Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, Gary Dittab, Yanofskyb MF, Katerc MM and Colombo L** (2003). MADS-Box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2603-2611.
- Fernández-Lozano A, Yuste-Lisbona FJ, Pérez-Martín F, Pineda B, Moreno V, Lozano, R and Angosto T** (2015). Mutation at the tomato *EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO)* locus impairs floral meristem development, thus promoting an increased number of floral organs and fruit size. *Plant Science* 232, 41-48.
- Ferrario S, Immink RGH, Shchennikova A, Busscher-Lange J and Angenent G** (2003). The MADS box gene *FBP2* is required for *SEPALLATA* function in petunia. *Plant Cell* 15: 914-925.
- Ferrario S, Shchennikova AV, Franken J, Immink RGH and Angenent GC** (2006). Control of floral meristem determinacy in petunia by MADS-box transcription factor. *Plant Physiology* 140: 890-898.

- Ficcadenti N, Sestili S, Pandolfini T, Cirillo C, Rotino GL and Spena A (1999).** Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Mol. Breeding*, 5, 463–470.
- Fink R, Gatti E, Gianfranceschi L, Gallavotti A, Isaac PG, Sari-Gorla M, Pè ME (2001).** Localization and fine mapping of *gaMS-1*, a male gametophytic mutant of maize.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C (2008).** Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 387-415.
- Firon N, Nepi M, Pacini E (2012).** Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. *Annals of Botany*, 109: 1201-1213.
- Fleishon S, Shani E, Ori N, Weiss D (2010).** Negative reciprocal interactions between gibberellin and cytokinin in tomato. *New Phytologist* 190: 609-617.
- Fos M, Nuez F, García-Martínez JL (2000).** The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiology*, 122: 471-479.
- Fu FQ, Mao WH, Shi K, Zhou YH, Asami T, Yu JQ (2008).** A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber. *Journal of Experimental Botany*. 59:2299-2308.
- Fuentes S and Vivian-Smith A (2009).** Fertilization and fruit initiation, in *Fruit Development and Seed Dispersal*, ed. L. Østergaard, Vol. 38 (Oxford: Wiley Blackwell Publishing), 107-171.
- Fujioka S and Yokota T (2003).** Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review Plant Biology* 54, 137-164.
- Gagne JM, Smalle J, Gingerich DJ, Walker JM, Yoo S, Yanagisawa S and Vierstra RD (2004).** Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 101:6803–8
- Gamble RL, Coonfield M and Schaller GE (1998).** Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 95:7825-29.
- García-Hurtado N, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Lopez-Gresa MP, Hedden P, Gong F, García-Martínez JL (2012).** *Journal of Experimental Botany*. 63: 5803-5813.
- García-Martínez JL, Martí M, Sabater T, Maldonado A, Vercher Y (1991).** Development of fertilized ovules and their role in the growth of the pea pod. *Physiologia Plantarum*, 83: 411-416.
- Geuten K and Irish V (2010).** Hidden variability of floral homeotic B genes in Solanaceae provides a molecular basis for the evolution of novel functions. *The Plant Cell* 22, 2562-2578.
- Gillaspy G, Ben-David H and Gruissem W (1993).** Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell*. 5: 1439-1451.

- Giménez E, Castañeda L, Pineda B, Pan IL, Moreno V, Angosto T, Lozano R** (2016). TOMATO AGAMOUS1 and ARLEQUIN/TOMATO AGAMOUSLIKE1 MADS-box genes have redundant and divergent functions required for tomato reproductive development. *Plant Mol Biol* 91:513-531.
- Giménez E, Dominguez E, Pineda B, Heredia A, Moreno V, Lozano R, Angosto T** (2015). Transcriptional activity of the MADS box ARLEQUIN/TOMATO AGAMOUS-LIKE1 gene is required for cuticle development of tomato fruit. *Plant Physiology* 166:1036-1048.
- Giménez E, Pineda B, Capel J, Antón MT, Atarés A, Pérez-Martín F, García-Sogo B, Angosto T, Moreno V and Lozano R** (2010). Functional Analysis of the Arlequin Mutant Corroborates the Essential Role of the ARLEQUIN/TAGL1 Gene during Reproductive Development of Tomato. *Plos one* 5 (12):e14427.
- Giovannoni J** (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*. 16: S170-S180.
- Giovannoni J** (2007). Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 283-289.
- Giovannoni J, Nguyen C, Ampofo B, Zhong S, Fei Z** (2017). The epigenome and transcriptional dynamics of fruit ripening. *Annual Review Plant Biology* 68:61-84.
- Glas JJ, Schimmel BCJ, Alba JM, Escobar-Bravo R, Schuurink RC, Kant MR** (2012). Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Molecular Sciences* 13: 17077-17103.
- Goetz M, Hooper LC, Johnson SD, Rodrigues JCM, Vivian-Smith A, Koltunow AM** (2007). Expression of aberrant forms of *AUXIN RESPONSE FACTOR8* stimulates parthenocarp in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiology*, 145: 351-366.
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM** (2006). *AUXIN RESPONSE FACTOR8* is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18: 1873-1886.
- Gómez P, Jamilena M, Capel J, Zurita S, Angosto T, Lozano R** (1999). *Stamenless*, a tomato mutant with homeotic conversions in petals and stamens. *Planta*, 209: 172–179.
- Gorguet B, Schipper D, van Lammeren A, Visser RGF, van Heusden A, W** (2009). *ps-2*, the gene responsible for functional sterility in tomato, due to non-dehiscent anthers, is the result of a mutation in a novel polygalacturonase gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 1199-1209.
- Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005). Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biology*, 7: 131–139.
- Gubler F, Kalla R, Roberts J, Jacobsen J** (1995). Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell* 7: 1879-1891.

- Guilfoyle TJ and Hagen G** (2007). Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 453-460.
- Guo H and Ecker JR** (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF^{EBF1/EBF2}-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* 115:667-77
- Gutierrez-Cortines ME and Davies B** (2000). Beyond the ABCs: ternary complex formation in the control of floral organ identity. *Trends in Plant Science* 5, 471-476.
- Hackett RM, Ho ChW, Lin Z, Foote HCC, Fray RG and Grierson D** (2000). Antisense inhibition of the *Nr* gene restores normal ripening to the tomato *Never-ripe* mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model. *Plant Physiology*. 124: 1079-1085.
- Hay A, Kaur H, Phillips AS, Hedden P, Hake S, Tsiantis M** (2002). The gibberellin pathway mediates knotted1-type homeobox function in plants with different body plans. *Current Biology*, 12: 1557-1565.
- Hedden P and Phillips AL** (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*, 5: 523-530.
- Ho L and Hewitt J** (1986). Fruit development. In *The Tomato Crop* (Ather-ton, J. and Rudich, J, eds). New York: Chapman and Hall, pp. 201-239.
- Ho L** (1996). Tomato. En: Zamki E. and Shaffer A.A. (eds.) *Photoassimilate distribution in plants and crops*. Marcel Dekker, New York, USA. pp. 709-772.
- Honma T and Goto K** (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409, 525-529.
- Hua J and Meyerowitz EM** (1998). Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94:261-71.
- Huang S, Cerny RE, Qi YL, Bhat D, Aydt CM, Hanson DD, Malloy KP, Ness LA** (2003). Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. *Plant Physiology*, 131: 1270-1282.
- Huang, BW, Routaboul JM, Liu MC, Deng W, Maza E, Mila I, Hu GJ, Zouine M, Frasse P, Vrebalov JT, Li ZG, van der Rest B, Bouzayen M** (2017). Overexpression of the class D MADS-box gene *SI-AGL11* impacts fleshy tissue differentiation and structure in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany* 17:4869:4884.
- Irish VF** (2003). The evolution of floral homeotic gene function. *Bioessays*, 25: 637-646.
- Ishida K, Yamashino T, Yokoyama A, Mizuno T** (2008). Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 49(1), 47-57.
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda K, Nishida I, Okada K** (2001). The DEFECTIVE IN ANTHWER DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell*: 13, 2191-2209.

- Itkin M, Seybold H, Breitel D, Rogachev I, Meir S and Aharoni A** (2009). TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *Plant Journal* 60: 1081-1095.
- Ito T and Meyerowitz EM** (2000). Overexpression of a gene encoding a cytochrome P450, *cup78A9*, induces large and seedless fruit in arabidopsis. *The plant cell* 12:1541-1550.
- Iwakawa H, Shinmyo A, Sekine M** (2006). Arabidopsis CDKA;1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. *Plant Journal* 45: 819-831.
- Jack T.** (2004). Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell*, 16(S): S1-S17.
- Jacobsen SE and Olszewski NE** (1991). Characterization of the arrest in anther development associated with gibberellin deficiency of the *gib-1* mutant of tomato. *Plant Physiology*, 97: 409-414.
- Joubès J, Phan TH, Just D, Rothan C, Bergounioux C, Raymond P, Chevalier C** (1999). Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase A during the early development of tomato fruit. *Plant Physiology* 121: 857-869.
- Joubès J, Walsh D, Raymond P and Chevalier C** (2000). Molecular characterization of the expression of distinct classes of cyclins during the early development of tomato fruit. *Planta* 211: 430-439.
- Kamiyoshihara Y, Iwata M, Fukaya T, Tatsuki M and Mori H** (2010). Turnover of LeACS2, a woundinducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in tomato, is regulated by phosphorylation/dephosphorylation. *Plant Journal*. 64:140–50.
- Karlova R, Rosin F, Busscher-Lange J, Parapunova V, Do P, Ferniec AR, Fraserd PD, Baxtere C, Angenentb GC, and de Maagd RA** (2011). Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell* 23:923-41.
- Kataoka K., Uemachi A, Yazawa S** (2003). Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in *pat-2* and auxin-induced parthenocarpic tomato fruits. *Scientia Horticulturae*, 98: 9-16.
- Kevany B, Tieman DM, Taylor M, Dal Cin V and Klee H** (2007). Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *Plant Journal*. 51:458–67
- Kinet JM and Peet MM** (1997). Tomato. En: Wien H.C. (ed.) *The Physiology of Vegetable Crops*. Wallingford, UK: Commonwealth Agricultural Bureau (CAB) International. pp. 207-258.
- Klee HJ and Giovannoni JJ** (2011). Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes. *The Annual Review of Genetics*. 45:41–59.

- Klap C, Yeshayahou E, Bolger AM, Arazi T, Gupta SK, Shabtai S, Usadel B, Salts Y, Barg R** (2017). Tomato facultative parthenocarpy results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function. *Plant Biotechnology Journal* 15: 634-647.
- Koshioka M, Nishijima T, Yamazaki H, Liu Y, Nonaka M and Mander LN** (1994). Analysis of gibberellins in growing fruits of *Lycopersicon esculentum* after pollination or treatment with 4-chlorophenoxyacetic acid. *The Journal of Horticultural Science* 69: 171-179
- Kramer EM, Dorit RL and Irish, VF** (1998). Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages. *Genetics*. 149: 765-783.
- Krochko JE, Abrams GD, Loewen GD, Abrams SR, Cutler AJ** (1998). (+)- Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Physiol* 118(3), 849-860.
- Kumar M, Singh VP, Arora A, Singh N** (2014). The role of abscisic acid (ABA) in ethylene insensitive *Gladiolus* (*Gladiolus grandiflora* Hort.) flower senescence. *Plant Physiology* 36:151-159.
- Lanahan MB, Yen H-C, Giovannoni JJ and Klee HJ** (1994). The Never-Ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 6:521-30.
- Larson RE and Paur S** (1948). The description and inheritance of a functionally sterile flower mutant in tomato and its probable value in hybrid tomato seed production. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 52: 355-364.
- Lashbrook CC, Tieman DM and Klee HJ** (1998). Differential regulation of the tomato *ETR* gene family throughout plant development. *Plant Journal* 15: 243-252.
- Lees E** (1995). Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* 7: 773-780.
- Lehmann S, Gumy C, Blatter E, Boeffel S, Fricke W and Rentsch D** (2011). *In planta* function of compatible solute transporters of the *AtProT* family. *Journal of Experimental Botany* 62(2), 787-796.
- Leide J, Hildebrandt U, Vogg G, Riederer M** (2011). The *positional sterile (ps)* mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. *Journal of Plant Physiology*, 168: 871-877.
- Lemaire-Chamley M, Petit J, García V, Just D, Baldet P, Germain V, Fagard M, Cheniclet C, Rothan C** (2005). Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiology*, 139: 750-769.
- Leseberg CH, Eissler CL, Wang X, Johns MA, Duvall MR and Mao L** (2008). Interaction study of MADS-domain proteins in tomato. *Journal of Experimental Botany*. 59: 2253-2265.
- Li Z, Hao Y, Yang Y, Deng W** (2010). Molecular cloning and expression of a cytochrome P450 gene in tomato. *Plant Growth Regulation* 61: 297-304.

- Lifschitz E and Eshed Y.** (2006). Universal florigenic signals triggered by *FT* homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *Journal of Experimental Botany* 57, 3405-3414.
- Lifschitz E, Eviatar, T, Rozman A, Shalit A, Goldshmidt A, Amsellem Z, Alvarez JP and Eshed Y** (2006). The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103, 6398-6403.
- Liljegren SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL and Yanofsky MF.** (2000). *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* 404: 766–770.
- Lin Z, Hong Y, Yin M, Li C, Zhang K and Grierson D** (2008). A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *Plant Journal* 55: 301–310.
- Lindsay DL, Sawhney VK, Bonham-Smith, PC** (2006). Cytokinin-induced changes in *CLAVATA1* and *WUSCHEL* expression temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 170: 1111-1117.
- Liu D, Wang D, Qin Z, Zhang D, Yin L, Wu L, Colasanti J, Li A, Mao L** (2014). The SEPALLATA MADS-box protein SLMBP21 forms protein complexes with JOINTLESS and MACROCALIX as a transcription activator for development of the tomato flower abscission zone. *Plant Journal* 77(2), 284-296.
- Liu Z, Boachon B, Lugan R, Tavares R, Erhardt M, Mutterer J, Demais V, Pateyron S, Brunaud V, Ohnishi T, Pencik A, Achard P, Gong F, Hedden P, Werk-Reichhart D, Renault H** (2015). A conserved cytochrome P450 evolved in seed plant regulates flower maturation. *Molecular Plant* 8, 1751-1765.
- Lohmann JU, Hong RL, Hobe M, Busch MA, Parcy F, Simon R and Weigel D** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell* 105, 793-803.
- Lozano R, Giménez-Camínero E, Cara B, Capel J and Angosto T** (2009). Genetic analysis of reproductive development in tomato. *International Journal of Development Biology* 53: 1635-1648.
- Ma H** (2005). Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 393-434.
- Malladi A, Johnson LK** (2011). Expression profiling of cycle genes reveals key facilitators of cell production during carpel development, fruit set, and fruit growth in apple (*Malus x domestica* Borkh.) *Journal of Experimental Botany*. 62:205-219.
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ and Seymour GB** (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics*. 38: 948-952.

- Mao L, Begum D, Chuang HW, Budiman MA, Szymkowiak EJ, Irish EE and Wing RA** (2000). JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature*. 406: 910-913.
- Mapelli S, Frova C, Torti G, Soressi GP** (1978). Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiology*, 19: 1281-1288.
- Mariotti L, Picciarelli P, Lombardi L, Ceccarelli N** (2011). Fruit-set and early fruit growth in tomato are associated with increases in indoleacetic acid, cytokinin, and bioactive gibberellin contents. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30: 405-415.
- Marsch-Martinez N, Ramos-Cruz D, Irepan Reyes-Olalde J, Lozano-Sotomayor P, Zuniga-Mayo VM, de Folter S** (2012). The role of cytokinin during *Arabidopsis* gynoecia and fruit morphogenesis and patterning. *Plant Journal*, 72: 222-234.
- Martí C, Orzáez D, Ellul P, Moreno V, Carbonell J, Granell T** (2007). Silencing of *DELLA* induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant Journal*, 52: 865-876.
- Martineau B, Houck CM, Sheehy RE and Hiatt WR** (1994). Fruit-specific expression of the *A. tumefaciens* isopentenyl transferase gene in tomato: effects on fruit ripening and defense-related gene expression in leaves. *Plant Journal* 5:11–19.
- Matsuo S, Kikuchi K, Fukuda M, Honda I, Imanishi S** (2012). Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 63, 5569-5579.
- Mazzucato A, Cellini F, Bouzayen M, Zouine M, Mila I, Minoia S, Petroszka A et al.** (2015). A TILLING allele of the tomato Aux/IAA9 gene offers new insights into fruit set mechanisms and perspectives for breeding seedless tomatoes. *Mol. Breeding*, 35, 22.
- McAtee P, Karim S, Schaffer R, David K** (2013). A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation and ripening. *Front Plant Science* Vol 74. Art 79.
- McCormick S** (2004). Control of male gametophyte development. *Plant Cell*, 16: S142-S153.
- McNeil KJ and Smith A.G.** (2005). An anther-specific cysteine-rich protein of tomato localized to the tapetum and microspores. *Journal of Plant Physiology*, 162: 457-464.
- McNeil KJ and Smith AG** (2010). A glycine-rich protein that facilitates exine formation during tomato pollen development. *Planta*, 231: 793-808.
- Medina M** (2010). Androesterilidad ligada a la obtención de frutos partenocárpicos en cultivares comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum L.*). Universidad Politécnica de Valencia.

- Meissner R, Chague V, Zhu Q, Emmanuel E, Elkind Y, Levy AA** (2000). A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. *Plant Journal*, 22: 265–274.
- Meyerowitz E M, Bowman J L, Brockman L L, Drews G N, Jack T J, Sieburth L, and Weigel D** (1991). A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development Supplement* 1, 157-167.
- Mironov V, De Veylder L, Van Montagu M, Inze D** (1999). Cyclin dependent kinases and cell division in plants: the nexus. *Plant Cell* 11: 509-521.
- Mitchell WD, Wittwer SH** (1962). Chemical regulation of flower sex expression and vegetative growth in *Cucumis sativus* L. *Science*, 136: 880-881.
- Mohan Ram HY, Jaiswal VS** (1972). Induction of male flowers on female plants of *Cannabis sativa* by gibberellins and its inhibition by abscissic acid. *Planta*, 53: 2543-2545.
- Molesini B, Pandolfini T, Rotino G.L, Dani V, Spena A** (2009). Aucsia genes silencing causes parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Physiology*, 149: 534-548.
- Molinero-Rosales N, Jamilena M, Zurita S, Gómez P, Capel J, and Lozano R** (1999). *FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant Journal* 20, 685-693.
- Molinero-Rosales N, Latorre A, Jamilena M, and Lozano R** (2004). *SINGLE FLOWER TRUSS* regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta* 218, 427-434.
- Montoya T, Nomura T, Yokota T, Farrar K, Harrison K, Jones JGD, Kaneta T, Kamiya Y, Szekeres M, Bishop GJ** (2005). Patterns of *Dwarf* expression and brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. *The Plant Journal* 42, 262-269.
- Morant M, Jorgensen K, Schaller H, Pinot F, Moller BL, Werck-Reichhart D, Bak S** (2007). CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. *The Plant Cell* 19: 1473-1487.
- Moreno-Risueno MA, Van Norman JM, Moreno A, Zhang J, Ahnert SE, Benfey PN** (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science* 329(5997):1306-11.
- Morrone D, Chen X, Coates RM, Peters RJ** (2010). Characterization of the kaurene oxidase CYP701A3, a multifunctional cytochrome P450 from gibberellin biosynthesis. *Biochemical Journal* 431(3) 337-347.
- Moussatche P and Klee H** (2004). Autophosphorylation activity of the *Arabidopsis* ethylene receptor multigene family. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:48734–41.

- Murray J.A, Jones A, Godin C, Traas J.** (2012). Systems analysis of shoot apical meristem growth and development: integrating hormonal and mechanical signaling. *Plant Cell*, 24: 3907-3919.
- Muschietti J, Dircks L, Vancanneyt G, McCormick S** (1994). LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense *LAT52* RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant Journal*, 6: 321-338.
- Nakano T, Kimbara J, Fujisawa M, Kitagawa M, Ihashi N, Maeda H, Kasumi T Ito Y** (2012). MACROCALYX and JOINTLESS interact in the transcriptional regulation of tomato fruit abscission zone development. *Plant Physiology* 158(1), 439-450.
- Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S and Nakano R** (1998). Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato during development and ripening. *Plant Physiology* 118: 1295–1305.
- Nakaune M, Hanada A, Yin Y.G, Matsukura C, Yamaguchi S, Ezura H** (2012). Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52: 28-37.
- Nash AF, Gardner RG, Henderson WR (1985).** Evaluation of allelism and seed set of eight stamenless tomato mutants. *HortScience*, 20: 440-442.
- Nashilevitz S, Melamed-Bessudo C, Aharoni A, Kossmann J, Wolf S, Levy A** (2009). The legwd mutant uncovers the role of starch phosphorylation in pollen development and germination in tomato. *The Plant Journal*. 57: 1-13.
- Nester JE and Zeevaart JAD** (1988). Flower development in normal tomato and a gibberellin-deficient (*ga-2*) mutant. *American Journal of Botany*, 75: 45-55.
- Nitsch J** (1950). Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *American Journal of Botany*, 37: 211-215.
- O'Malley RC, Rodriguez FI, Esch JJ, Binder BM, O'Donnell P, Klee HJ and Bleeker AB** (2005). Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato. *Plant Journal*. 41:651–59
- Oeller PW, MinWong L, Taylor LP, Pike DA and Theologis A** (1991). Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254:437–39.
- Olimpieri I, Siligato F, Caccia R, Mariotti L, Ceccarelli N, Soressi GP, Mazzucato A** (2007). Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta*, 226: 877-888.

- Olszewski N, Sun TP, Gubler F** (2002). Gibberellin signalling, biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, 14: 61-80.
- Omidvar V, Mohorianu I, Dalmay T, Zheng Y, Fei Z, Pucci A, Mazzucato A, Vererova V, Sedlarova M, Fellner M** (2017). Transcriptional regulation of male-sterility in *7B-1* male-sterile tomato mutant. *Plos One* 12(2).
- Omidvar V, Mohorianu I, Dalmay T, Zheng Y, Fei Z, Pucci A, Mazzucato A, Vererova V, Sedlarova M, Fellner M** (2009). Transcriptional regulation of male-sterility in *7B-1* male-sterile tomato mutant. *Plos one* 12(2):10.1371
- Ori N, Juarez MT, Jackson D, Yamaguchi J, Banowetz GM, Hake S** (1999). Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. *The Plant Cell*, 11: 1073–1080.
- Owen HA, Makaroff CA** (1995). Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma*, 185: 7-21.
- Ozga JA, van Huizen R, Reinecke DM** (2002). Hormone and seed-specific regulation of pea fruit growth. *Plant Physiology*, 128: 1379-1389.
- Pacini E** (1990). Tapetum and microspore function. En: Blackmore S. y Knox R.B. (eds.) *Microspores: evolution and ontogeny*. Ediciones Academic Press, London.
- Pacini E** (1996). Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction*, 9: 362-366.
- Pacini E, Franchi GG** (1998). Pollen dispersal units, gynoecium and pollination. *Reproductive Biology*. Royal Botanic Gardens, Kew, in press.
- Pacini E, Franchi GG, Hesse M** (1985). The tapetum: its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Systematics and Evolution*, 149: 155-185.
- Pan IL, McQuinn R, Giovannoni JJ and Irish VF** (2010). Functional diversification of AGAMOUS lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. *Journal of experimental Botany* 61(6): 1795-1806.
- Pandolfini T** (2009). Seedless fruit production by hormonal regulation of fruit set. *Nutrients* 1(2), 168-177.
- Pandolfini T, Molesini B, Spina A** (2007). Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends in Plant Science*, 12: 327-329.
- Parish R and Li SF** (2010). Death of a tapetum: a programme of developmental altruism. *Plant Science*, 178: 73-89.
- Pascual L, Blanca JM, Cañizares J, Nuez F** (2009). Transcriptomic analysis of tomato carpel development reveals alterations in ethylene and gibberellin synthesis during *pat3/pat4* parthenocarpic fruit set. *BMC Plant Biology*, 9: 67.

- Pattison RJ and Catala C** (2012). Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the *PIN* and *AUX/LAX* gene families. *Plant Journal*, 70: 585-598.
- Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E and Yanofsky MF** (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405, 200-203.
- Philouze J.** (1978). Comparaison des effets des genes *J* et *J-2* conditionnant le caractere "jointless" chez la tomate et les relations d'epistasie entre *j* et *j-2* dans les lignees de meme type varietal. *Annales d'Amelioration des Plantes* 28: 431-445.
- Pike LM, Peterson CE** (1969). Gibberellin A4/A7, for induction of staminate flowers on the gynoecium cucumber. *Euphytica*, 18: 106-109.
- Pineda B, García-Avellán JO, Antón T, Pérez F, Moyano E, García-Sogo B, Campos JF, Angosto T, Morales B, Capel J, Moreno V, Lozano R, Bolarín MC, Aterés A** (2012). Tomato: Genomic Approaches for Salt and Drought Stress Tolerance. *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress, Volume 1 & Volume 2*, 1085-1120.
- Pineda B, Giménez-Caminero E, García-Sogo B, Antón MT, Atarés A, Capel J, Lozano R, Angosto T, Moreno V** (2010). Genetic and physiological characterization of the *Arlequin* insertional mutant reveals a key regulator of reproductive development in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 51: 435-447.
- Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, Wisman E, and Yanofsky MF** (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424: 85-88.
- Pnueli L, Abu-Abeid M, Zamir D, Nacken W, Schwarz-Sommer Z and Lifschitz E** (1991). The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant Journal* 1, 255-266.
- Pnueli L, Hareven AD, Rounsley SD, Yanofsky MF and Lifschitz E** (1994a) Isolation of the tomato AGAMOUS gene TAG1 and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell*. 6: 163-173.
- Pnueli L, Hareven D, Broday L, Hurwitz C and Lifshitz E** (1994b). The TM5 MADS box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. *Plant Cell* 6, 175-186.
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C and Genschik P** (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signalling by two *Arabidopsis* F-box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* 115:679–89.
- Proels RK, Gonzalez MC, Roitsch T** (2006). Gibberellin-dependent induction of tomato extracellular invertase *Lin7* is required for pollen development. *Functional Plant Biology*, 33: 547-554.

- Quinet M, Bataille G, Dobrev PI, Capel C, Gómez P, Capel J, Lutts S, Motyka V, Angosto T and Lozano R** (2014). Transcriptional and hormonal regulation of petal and stamen development by *STAMENLESS*, the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) orthologue to the BPclass *APETALA3* gene. *Journal of Experimental Botany* 65, 2243-2256.
- Quinet M, Dielen V, Batoko H, Boutry M, Havelange A and Kinet JM** (2006b). Genetic interactions in the control of flowering time and reproductive structure development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *New Phytologist* 170, 701-710.
- Quinet M, Kinet JPM and Lutts S** (2011). Flowering response of the *uniflora:blind:self-pruning* and *jointless:uniflora:self-pruning* tomato (*Solanum lycopersicum*) triple mutants. *Physiologia Plantarum* 141, 166-176.
- Rastogi R and Sawhney VK** (1988). Suppression of stamen development by CCC and ABA in tomato floral buds cultured *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* 133(5), 620-624.
- Reed JW** (2001). Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 6: 420-425.
- Ren Z, Li Z, Miao Q, Yang Y, Deng W, Hao Y** (2011). The auxin receptor homologue in *Solanum lycopersicum* stimulates tomato fruit set and leaf morphogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 62: 2815-2826.
- Rieu I, Wolters-Arts M, Derksen J, Mariani C, Weterings K** (2003). Ethylene regulates the timing of anther dehiscence in tobacco. *Planta*, 217: 131-137.
- Robles P and Pelaz S** (2005). Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Developmental Biology*. 49, 633-643
- Rojas-Gracia** (2016). Identificación de genes que regulan el desarrollo del ovario y el cuajado del fruto en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis Doctoral. Universidad politécnica de Valencia.
- Rojas-Gracia P, Roque E, Medina M, Rochina M, Hamza R, Angarita MP, Moreno V, Pérez F, Lozano R, Cañas L, Pio-Beltrán J, Gómez-Mena C.** (2017). The parthenocarpic hydra mutant reveals a new function for a SPOROCTELESS-like gene in the control of fruit set in tomato. *New Phytologist* 214 (3): 1198-1212.
- Ross JJ, Reid JB, Swain SM, Hasan O, Poole AT, Hedden P, Willis CL** (1995). *The Plant Journal* 7(3), 513-523.
- Rotino GL, Perri E, Zottini M, Sommer H, Spena A** (1997). Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnology* 15: 1398-1401.
- Rottmann WH, Peter GF, Oeller PW, Keller JA, Shen NF, Nagy BP, Taylor LP, Campbell AD and Theologis A** (1991). 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J. Mol. Biol.* 222:937-62

- Ruan YL, Patrick JW, Bouzayen M, Osorio S, Fernie, AR** (2012). Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends in Plant Science*, 17: 656–665.
- Sabelli PA, Larkins BA** (2009). The development of endosperm in grasses. *Plant Physiol.* 149: 14-26.
- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta O, Sakata K, Mizutani M** (2004). Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid *Plant Physiol.* 134(4) 1439-49.
- Sanders PM, Lee PY, Biesgen C, Boone JD, Beals TP, Weiler EW, Goldberg RB** (2000). The *Arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *Plant Cell*, 12: 1041-1061.
- Sari-Gorla M, Ferrario S, Villa M, Pè E** (1996). *gaMS-1*: A gametophytic male sterile mutant in maize. *Sexual Plant Reproduction* 9(4), 216-220.
- Sawhney RN** (1992). The role of Lr34 in imparting durable resistance to wheat leaf rust through gene interaction. *Euphytica* 61: 9-12.
- Sawhney VK** (1974). Morphogenesis of the *stamenless-2* mutant of tomato: III. Relative levels of gibberellins in the normal and mutant plants. *Journal of Experimental Botany*, 25: 1004-1009.
- Sawhney VK and Shukla A** (1994). Male sterility in flowering plants: Are plant growth substances involved? *American Journal of Botany*, 81: 1640-1647.
- Schaller GE and Bleecker AB** (1995). Ethylene binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science* 270:1809–11
- Schijlen EG, deVos CH, Martens S, Jonker HH, Rosin FM, Molthoff JW, Tikunov YM, Angenent GC, vanTunen AJ, Bovy AG** (2007). RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiology*, 144: 1520-1530.
- Schmitz G, Tillmann E, Carriero F, Fiore C, Cellini F and Theres K** (2002). The tomato *Blind* gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99, 1064-1069.
- Schmülling T, Fladung M, Grossmann K and Schell J** (1993). Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. 3(3), 371-382.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jürgens G and Laux T** (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 100, 635-644.
- Schwacke R, Grallath S, Breitkreuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB, Rentsch D** (1999). LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell*, 11: 377–391.
- Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG** (2004). Stamen structure and function. *Plant Cell*, 16: S46-S60.

- Senatore A, Trobacher CP, Greenwood JS** (2009). Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato. *Plant Physiology*, 149: 775-790.
- Serrani JC, Fos M, Atares A, Garcia-Martinez JL** (2007). Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv MicroTom of tomato. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26: 211-221.
- Serrani JC, Ruiz-Rivero O, Fos M and García-Martínez JL.** (2008) Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *Plant Journal* 56: 922–934.
- Seymour G, Ryder C, Cevik V, Hammond J, Popovich A, et al** (2010). A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria x annanassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue. *Journal of Experimental Botany* 62:1179–88
- Shalit A, Rozman A, Goldshmidt A, Alvarez JP, Bowman JL, Eshed Y and Lifschitz E** (2009). The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106, 8392-8397.
- Sheoran IS, Ross ARS, Olson DJH, Sawhney VK** (2009). Differential expression of proteins in the wild type and 7B-1 male-sterile mutant anthers of tomato (*Solanum lycopersicum*): a proteomic analysis. *J Proteom* 71: 624-636.
- Shinozaki Y, Hao S, Kojima M, Sakakibara H, Ozeki-Iida Y, Zheng Y, Fei Z, Zhong S, Giovannoni JJ, Rose J.K.C, Okabe Y, Heta Y, Ezura H, Ariizumi T** (2015). Ethylene suppresses tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit set through modification of gibberellin metabolism. *The Plant Journal*, 83: 237-251.
- Shivanna KR and Johri BM** (1985). *The angiosperm pollen; structure and functions*. Ediciones John Wiley and Sons, New Delhi.
- Sicard A, Petit J, Mouras A, Chevalier C, Hernould M** (2008). Meristem activity during flower and ovule development in tomato is controlled by the mini zinc finger gene *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY*. *Plant Journal*, 55: 415-427.
- Singh S and Sawhney VK** (1997). Abscisic acid in a male sterile tomato mutant and its regulation by low temperature. *Journal of Experimental Botany* 49(319), 199-203.
- Singh S, Sawhney VK and Pearce DW** (1992). Temperature effects on endogenous indole-3-acetic acid levels in leaves and stamens of the normal and male sterile “*stamenless-2*” mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant, Cell and Environment* 15, 373–377.
- Sinha R, Rajam MV** (2013). RNAi silencing of three homologues of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in tapetal tissue of tomato results in male sterility. *Plant Mol Biol.* 82 (1-2):169-180.
- Smirnova A, Leide J, Riederer M** (2013). Deficiency in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-Coenzyme A synthase of tomato impairs microgametogenesis and causes floral organ fusion. *Plant Physiology*, 161: 196-209.

- Smith O** (1935). Pollination and life-history studies of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Cornell University, *Agricultural Experiment Station*. Paper 133.
- Sotelo-Silveira M, Cucinotta M, Chauvin AL, Chávez RA, Colombo L, Marsch-Martínez N, de Folter S** (2013). Cytochrome P450 *CYP78A9* is involved in arabidopsis reproductive development. *Plant signaling & Behaviour* 162: 779-799.
- Spena A, Estruch JJ, Prinsen E, Nacken W, Van Onckelen H, Sommer H** (1992). Anther-specific expression of the *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* increases content in anthers and alters anther development and whole flower growth. *Theoretical and Applied Genetics*, 84: 520-527.
- Srivastava A and Handa AK** (2005). Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24: 67-82.
- Sun B, Looi LS, Guo S, He Z, Gan ES, Huang J, Xu Y, Wee WPY and Ito T** (2014). Timing mechanism dependent on cell division is invoked by Polycomb eviction in plant stem cells. *Science* 343, 1248559.
- Sun TP and Gubler F** (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 197-223.
- Szymkowiak EJ and Irish EE** (1999). Interactions between jointless and Wild-Type Tomato Tissues during Development of the Pedicel Abscission Zone and the Inflorescence Meristem. *The Plant Cell* 11, 159-175.
- Szymkowiak EJ and Irish EE** (2006). *JOINTLESS* suppresses sympodial identity in inflorescence meristems of tomato. *Planta* 223, 646-658.
- Tadiello A, Pavanello A, Zanin D, Caporali E, Colombo L, Rotino GL, Trainotti L and Casadoro G** (2009). A *PLENA*-like gene of peach is involved in carpel formation and subsequent transformation into a fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany* 60: 651–661.
- Talon M, Zacarias L, Primomillo E.** (1990). Hormonal changes associated with fruit-set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Physiologia Plantarum*, 79: 400-406.
- Taylor IB, Burbidge A, Thompson AJ** (2000). Control of abscisic acid synthesis 51(350), 1563-1574.
- Theißen G, Meizer R and Rümpler F** (2016). MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution. *The company of biologists* 143, 3259-3271.
- Thomas SG, Sun TP (2004)** Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiology*, 135: 668-676.
- Tieman DM and Klee HJ** (1999). Differential expression of two novel members of the tomato ethylenereceptor family. *Plant Physiology*. 120:165–72

- Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG and Klee HJ** (2001). Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant Journal*. 26:47–58
- Tieman DM, Taylor MG, Ciardi JA and Klee HJ** (2000). The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 97: 5663-5668.
- Tivendale ND, Ross JJ, Cohen JD** (2014). The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science* 19(1), 44-51.
- Traw MB and Bergelson J** (2003). Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid and gibberellin on induction of thricomes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133(3) 1367-1375.
- Tronickova, E** (1962). New type of functional male sterility in tomato. *Ved Prace Vysk Ust Rostl Vyr Praha-Ruzine* 6: 29-39.
- Tsuji H, Aya K, Ueguchi-Tanaka M et al.** (2006). GAMYB controls different sets of genes and is differentially regulated by microRNA in aleurone cells and anthers. *Plant J*. 47: 427-444.
- Tucker GA, Schindler CB and Roberts JA** (1984). Flower abscission in mutant tomato plants. *Planta* 160, Number2, 164-167.
- Twell D** (2010). Male gametophyte development. En: Pua E.-C, Davey M.R. (eds.) *Plant developmental biology – Biotechnological perspectives. Volume 1*. Ediciones Springer, Heidelberg. pp. 225-244.
- Vandenbussche M, Zethof J, Souer E, Koes R, Tornielli GB, Pezzotti M, Ferrario S, Angenent GC, Gerats T** (2003). Towards the analysis of the petunia MADS box gene family by reverse and forward transposon insertion mutagenesis approaches: B, C and D floral organ identity functions require SEPALLATA-like MADS box genes in petunia. *Plant Cell* 15(11), 2680-93.
- Varga A, Bruinsmaa J** (1976). Roles of seeds and auxins in tomato fruit growth. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 80: 95-104.
- Vivian-Smith A, Luo M, Chaudhury A, Koltunow AM** (2001). Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development*, 128: 2321-2331.
- Vrebalov J, Pan IL, Matas Arroyo AJ, McQuinn R, Chung MY, Poole M, Rose J, Seymoure G, Grandillo S, Giovannoni J and Irish VF** (2009). Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *Plant Cell* 21: 3041–3062.
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, and Giovannoni J** (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato *Ripening-Inhibitor (Rin)* locus. *Science* 296, 343-346.

- 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 Phytologist*. 177:60-76.
- Vriezen WH, Feron R, Maretto F, Keijman J, Mariani C** (2007). Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist*. 177:60:76
- Vysotskaya LB, Korobova AV, Veselov SY, Dodd IC, Kudoyarova GR** (1999). ABA modulation of shoot cytokinin oxidase activity: assessing its impacts on cytokinin status and biomass allocation of nutrient-deprived durum wheat. *Functional Plant Biology* 36(1) 66-72.
- Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latché A, Pech JC, Bouzayen M** (2005). The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *The Plant Cell*, 17: 2676-2692.
- Wang H, Schauer N, Usadel B, Frasse P, Zouine M, Hernould M, Latché A, Pech JC, R. Fernie AR and Bouzayen M** (2009). Regulatory Features Underlying Pollination-Dependent and -Independent Tomato Fruit Set Revealed by Transcript and Primary Metabolite Profiling. *The Plant Cell* 21:1428-1452.
- Wang WY, Hall AE, O'Malley R and Bleecker AB** (2003). Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 100:352–57.
- Wani SH, Kumar V, Shiriam V, Sah SK** (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*. 4(3), 162-176.
- Wasson AP, Pellerone FI, Mathesius U** (2006). Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell*, 18: 1617-1629.
- Weigel D, and Meyerowitz EM** (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78, 203-209.
- Wellmer F, Graciet E and Riechmann JL** (2014). Specification of floral organs in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 65, 1-9.
- Wilkinson J, Lanahan M, Yen H, Giovannoni JJ and Klee HJ** (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science* 270: 1807–1809.
- Wilkinson S, Kudoyarova GR, Veselov DS, Arkhipova TN, Davies WJ** (2012) *Journal of Experimental Botany* 63(9), 3499-509.

- Wismer PT, Proctor JTA, Elfving, DC** (1995). Benzyladenine affects cell-division and cell-size during apple fruit thinning. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 120: 802-807.
- Xu C, Liberatore KL, MacAlister CA, Huang Z, Chu YPH, Jiang K, Brooks C, Ogawa-Ohnishi M, Xiong G, Pauly M et al** (2015). A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics* 47, 784-792.
- Yamamoto Y, Nishimura M, Hara-Nishimura I, Noguchi T** (2003). Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 44: 1192-1201.
- Yang J, Zhang J, Huang Z, Wang Z, Zhu Q, Liu L** (2002). Correlation of cytokinin levels in the endosperms and roots with cell number and cell division activity during endosperm development in rice. *Annals of Botany*, 90: 369-377.
- Yang SF** (1987). The role of ethylene and ethylene synthesis in fruit ripening. In *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology*, ed. W Thompson, E Nothnagel, R Huffaker, pp. 156–65, Rockville, MD:Am. Soc. Plant Physiol.
- Yang WC and Sundaesan V** (2000). Genetics of gametophyte biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Biology* 3:53-57.
- Yang Y, Wu Y, Pirrello J, Regad F, Bouzayen M, Deng W and Li Z** (2010). Silencing SI-EBF1 and SI-EBF2 expression causes constitutive ethylene response phenotype, accelerated plant senescence, and fruit ripening in tomato. *Journal of Experimental Botany*. 61:697-708.
- Yokotani N, Tamura S, Nakano R, Inaba A and Kubo Y** (2003). Characterization of a novel tomato EIN3-like gene (LeEIL4). *Journal of Experimental Botany*. 54:2775–76.
- Yuste-Lisbona FJ, Quinet M, Fernández-Lozano A, Pineda B, Moreno V, Angosto T and Lozano R** (2016). Characterization of *vegetative inflorescence (mc-vin)* mutant provides new insight into the role of *MACROCALYX* in regulating inflorescence development of tomato. *Scientific Reports* 6, 18796.
- Zhang X and Li S** (2017). Expansion of chemical space for natural products by uncommon P450 reactions. *Natural Product Reports* 34(9), 1061-1089.
- Zhou D, Mattoo A and Tucker M** (1996). Molecular cloning of a tomato cDNA encoding an ethylene receptor. *Plant Physiology*. 110:1435–36.