

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

## Impacto del silenciamiento génico de *CLAVATA3* y *FASCIATED INFLORESCENCE* en variedades de tomate de fruto bilocular o multilocular

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL

ALUMNO: YAIZA GARA PADILLA HERRERO

TUTORES: Vicente Moreno y Benito Pineda  
TUTORES EXTERNOS: Carlos Ribelles y Mariola Plazas

**CURSO ACADÉMICO: 2018-2019**

*Valencia, septiembre de 2019*

Tipo Licencia





# AGRADECIMIENTOS

Como en cada etapa de la vida, en la etapa universitaria hay personas que nos acompañan y dejan huella. Son sus aportaciones las que contribuyen al crecimiento personal haciendo que, por muchos años que puedan pasar, nunca sea posible olvidar pequeños detalles, nimiedades a simple vista, pero con un gran significado para el que las sepa contemplar.

Gracias a Vicente Moreno, jefe supremo, capitán del barco que es este laboratorio, guía y conductor de todo y de todos, por acogerme para la realización de este trabajo, por su experiencia y profesionalidad y sobre todo por permitirme verle jugar y ganar al pádel.

Gracias a Benito Pineda por la oportunidad, por su sabiduría, por su dedicación y por estar siempre disponible para aclarar cualquier duda hasta el más mínimo detalle. Aunque todo lo anterior solo es posible gracias a sus dos cerebros, en los que a cada momento fluyen y confluyen miles de ideas y conocimientos. Gracias por compartir esa virtud.

Gracias a los compañeros del laboratorio, que estoy segura echaré de menos en esta nueva etapa de mi vida. Gracias Carlos por todo tu tiempo, por tu ayuda indispensable y tu predisposición, sin ti este trabajo no hubiera sido posible. Gracias Begoña por tu cariño, por hacerme más llevaderos los días en el laboratorio y, cómo no, por tus obsequios de chocolate. Gracias a Mariola por sus lecciones de estadística y diseño de experimentos, que tan útiles han sido para la realización de este trabajo como lo serán para el futuro. Gracias a Ramón, Alba, Nacho, Alejandro y Marybel por su compañía, más frecuente en algunos casos que en otros, pero de todos agradecida.

Gracias a mis compañeros del máster, que tan importantes han sido para mí estos dos años, por todo el apoyo que nos hemos dado tanto en lo académico como en lo personal, me gustaría poder contar con vosotros toda la vida.

Gracias a mi familia, por el amor incondicional que me brindan y me han brindado siempre. Gracias por hacerme la persona que soy hoy en día y por estar orgullosos de ello. Gracias por estar a mi lado en todas mis decisiones, independientemente de si han sido o no acertadas, con esa fe ciega que solo da el carné de padres. Gracias por ser un ejemplo y por hacerme sentir que todo es superable y que si no lo es, mi familia estará conmigo. Gracias.

Gracias a Julio, por compartir su entusiasmo, su optimismo y su humor cuando carezco de ello, sacándome una sonrisa en el peor de los momentos y dejando a un lado su propia realidad para volcarse en la mía. Gracias por aparecer en mi vida.



# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE .....	I
ÍNDICE DE TABLAS .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
RESÚMENES.....	VI

## ÍNDICE

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. Estructura del SAM a nivel anatómico y funcional .....	1
1.2. Regulación génica de la actividad del SAM a través de la vía CLAVATA/WUSCHEL .....	2
1.3. Los genes <i>CLV3</i> y <i>FIN</i> .....	3
1.4. Origen y genes implicados en el calibre del fruto de tomate .....	4
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>7</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>9</b>
3.1 Material vegetal .....	9
3.2 Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i> .....	9
3.2.1 Esterilización de semillas.....	9
3.2.2 Germinación y obtención de plántulas axénicas.....	9
3.2.3 Cultivo de explantes primarios.....	10
3.2.4 Inducción de organogénesis.....	10
3.2.5 Obtención de plantas axénicas.....	10
3.2.6 Obtención de plántulas axénicas.....	11
3.2.7 Análisis de la resistencia-sensibilidad a la kanamicina.....	11
3.3. Caracterización del desarrollo vegetativo y la producción .....	11
3.4. Análisis genético .....	12
3.5. Tratamiento estadístico de los datos.....	12
<b>4. Resultados.....</b>	<b>13</b>
4.1. Resultados preliminares.....	13
4.2. Identificación de progenies de simple copia .....	14
4.3. Caracterización fenotípica de las líneas de silenciamiento en condiciones de cultivo <i>in vitro</i> .....	16
4.3.1 Identificación de plantas transgénicas.....	17

4.3.2 Caracterización de la respuesta morfogénica .....	17
4.3.3 Caracterización del fenotipo de las plantas axénicas: crecimiento de la parte aérea y desarrollo radicular adventicio.....	18
4.3.4 Caracterización del fenotipo de las plántulas: crecimiento de la parte aérea y desarrollo radicular embrionario .....	20
4.4. Caracterización fenotípica de las líneas de sobreexpresión en invernadero .....	23
4.4.1. Caracterización del desarrollo vegetativo .....	23
4.4.1.a. Distancia y número de fitómeros desde la base hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias.....	23
4.4.1.b. Efectos del silenciamiento de <i>FIN</i> sobre el desarrollo foliar .....	25
4.4.2. Caracterización del desarrollo reproductivo .....	26
4.4.2.a. Caracterización del número de órganos en los verticilos florales .....	26
4.4.2.b. Caracterización de diferentes caracteres relacionados con la producción .	29
4.4.2.c. Identificación de un mutante del desarrollo en la progenie TG2 Ri- <i>CLV3</i> -4 de Moneymaker .....	31
<b>5. Discusión .....</b>	<b>37</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>41</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>42</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla R1a</b>	Caracterización de frutos en plantas transgénicas (TG1) de tomate p73 con los genes <i>FIN</i> (Ri- <i>FIN</i> ) y <i>CLV3</i> (Ri- <i>CLV3</i> ) silenciados.....	13
<b>Tabla R1b</b>	Caracterización de frutos en plantas transgénicas (TG1) de tomate MoneyMaker con los genes <i>FIN</i> (Ri- <i>FIN</i> ) y <i>CLV3</i> (Ri- <i>CLV3</i> ) silenciados.....	14
<b>Tabla R2</b>	Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina en distintas líneas Ri- <i>FIN</i> y Ri- <i>CLV3</i> de p73 y MoneyMaker (MM) .....	15
<b>Tabla R3</b>	Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo en el WT y en las líneas Ri- <i>FIN</i> -31 y Ri- <i>CLV3</i> -38 de p73.....	29
<b>Tabla R4</b>	Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo en el WT y en las líneas Ri- <i>FIN</i> -18, Ri- <i>CLV3</i> -24 y Ri- <i>CLV3</i> -4 .....	30
<b>Tabla R5</b>	Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo en el WT y en plantas no mutantes (Ri- <i>CLV3</i> -4) y mutantes (Mut- <i>CLV3</i> -4) de la línea Ri- <i>CLV3</i> -4 ...	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I1</b>	Ruta de retroalimentación CLV/WUS en el SAM.....2
<b>Figura I2</b>	Árbol filogenético de la familia <i>FIN/HPAT</i> a partir de secuencias completas que codifican para proteínas putativas. Se ilustran en color rojo los genes de tomate y en color azul los de Arabidopsis .....4
<b>Figura I3</b>	Representación más antigua de una planta de tomate en Europa .....4
<b>Figura R1</b>	Caracterización in vitro. A partir de una plántula de 7-10 días, se extrajeron: i) 2 explantes de cotiledón para evaluar la respuesta morfogénica en medio con citoquininas, ii) 1-2 explantes de hipocótilo para evaluar la resistencia/sensibilidad a la kanamicina de esa planta, y iii) el ápice para evaluar el crecimiento de la planta axénica .....16
<b>Figura R2</b>	Identificación de plantas transgénicas a partir de explantes de hipocótilo. a) Explantes de hipocótilo procedentes de una planta transgénica, resistente a kanamicina. b) Explantes de hipocótilo obtenidos de una planta wild type, sensible a kanamicina .....17
<b>Figura R3</b>	Respuesta morfogénica en explantes de cotiledón de plantas WT de Moneymaker (a) y p73 (d), de plantas transgénicas Ri- <i>CLV3</i> de Moneymaker (b) y p73 (e), y de plantas transgénicas Ri- <i>FIN</i> de Moneymaker (c) y p73 (f).....18
<b>Figura R4</b>	Desarrollo de raíces adventicias en plantas WT y plantas transgénicas .....19
<b>Figura R5</b>	Manchas necróticas/cloróticas en hojas de plantas de Moneymaker (izq.) y p73 (dcha.) con el gen <i>FIN</i> silenciado .....19
<b>Figura R6</b>	Número de raíces secundarias en plántulas de las líneas transgénicas Ri- <i>CLV3</i> -4, Ri- <i>CLV3</i> -24, Ri- <i>FIN</i> -18 y en el WT de Moneymaker tras la primera y segunda semana de cultivo .....20
<b>Figura R7</b>	Fenotipo de una planta no mutante (a) y de una planta con una mutación tipo <i>seedling lethal</i> (b) tras dos semanas de cultivo .....21
<b>Figura R8</b>	Número de raíces secundarias tras la primera y segunda semana de cultivo en plantas WT y plantas de la línea Ri- <i>CLV3</i> -24 de Moneymaker (MM) de fenotipo WT ( <i>CLV3</i> -24) y mutante ( <i>CLV3</i> -24-SL) .....22
<b>Figura R9</b>	Distancia en centímetros (izq.) y número de fitómeros (dcha.) desde la base hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias en p73 y en las líneas Ri- <i>FIN</i> -31 y Ri- <i>CLV3</i> -38 .....24
<b>Figura R10</b>	Distancia en centímetros (izq.) y número de fitómeros (dcha.) desde la base hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias en MM y las líneas Ri- <i>FIN</i> -18, Ri- <i>CLV3</i> -24 y Ri- <i>CLV3</i> -4 .....25
<b>Figura R11</b>	Efectos del silenciamiento de <i>FIN</i> sobre el desarrollo foliar en planta completa (a), rama con hojas desarrolladas (b), haz de la hoja (c) y envés de la hoja (d) .....26

<b>Figura R12</b>	Número de órganos florales en el WT y en las líneas transgénicas Ri- <i>FIN</i> -31 y Ri- <i>CLV3</i> -38.....	27
<b>Figura R13</b>	Flor de una planta WT (a) y de una planta de la línea Ri- <i>CLV3</i> -24 con mayor número de órganos florales (b) .....	28
<b>Figura R14</b>	Número de órganos florales en el WT y en las líneas Ri- <i>FIN</i> -18, Ri- <i>CLV3</i> -24 y Ri- <i>CLV3</i> -4 .....	28
<b>Figura R15</b>	Corte de frutos WT de MM (arriba izq.) y de p73 (arriba dcha.) y de líneas transgénicas Ri- <i>CLV3</i> de MM (abajo izq.) y de p73 (abajo dcha.) .....	31
<b>Figura R16</b>	Hojas desarrolladas de una planta WT (izq.) y de una planta mutante (dcha.) de la línea Ri- <i>CLV3</i> -4 .....	32
<b>Figura R17</b>	Distancia en centímetros (izq.) y número de fitómeros (dcha.) desde la base hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias en MoneyMaker (MM), en plantas Ri- <i>CLV3</i> -4 sin mutación (Ri- <i>CLV3</i> -4) y con mutación (Mut- <i>CLV3</i> -4) .....	32
<b>Figura R18</b>	Diferencias en el fenotipo de plantas WT (izq.) y plantas mutantes (dcha.) in vitro en plántula (a) y en hoja en detalle (b) .....	33
<b>Figura R19</b>	Flores en estadio de antesis de una planta WT (izq.) y de una planta mutante (dcha.) de la línea Ri- <i>CLV3</i> -4 .....	34

## Impacto del silenciamiento génico de *CLAVATA3* y *FASCIATED INFLORESCENCE* en variedades de tomate de fruto bilocular o multilocular

### Resumen

La transición floral implica un cambio en la identidad vegetativa del meristemo apical del tallo (SAM), que se transforma en meristemo de inflorescencia, dando lugar a la formación de otros meristemos de inflorescencia secundarios, y estos a su vez se transforman en meristemos florales. 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. Entre los factores que determinan el tamaño final del fruto de tomate se encuentra la tasa de división celular en el meristemo floral, aunque el principal responsable del tamaño final del fruto es el número de carpelos en la flor. Este carácter viene determinado por el tamaño del meristemo floral, cuya regulación implica un mecanismo de retroalimentación negativo en el que juega un papel importante la vía de señalización extracelular formada por los genes *CLAVATA* (*CLV*) y *WUSCHEL* (*WUS*). El análisis genético de mutantes y los estudios de genética reversa han permitido conocer la base genética y el mecanismo molecular de la ruta *CLV/WUS*. Así, por ejemplo, mutaciones en los genes *CLV* conducen a un aumento del tamaño del meristemo floral a través de la expansión de los dominios de expresión de *WUS*, lo que da lugar a flores con un mayor número de carpelos. En tomate, el fenotipo de ausencia de función del gen *FASCIATED INFLORESCENCE* (*FIN*), que codifica una hidroxiprolina *O*-arabinosiltransferasa, es similar al de los mutantes *clavata* (*clv*).

En este trabajo de investigación se ha evaluado el impacto del silenciamiento de los genes *CLV3* y *FIN* en dos variedades diferentes de tomate, a saber, *Moneymaker* y *p73*, que desarrollan frutos biloculares o multiloculares respectivamente. Para abordar los objetivos del trabajo, previamente se han seleccionado progenies transgénicas de simple copia. Sobre la base del papel que desempeñan estos genes en la regulación de la actividad meristemática, se ha realizado una evaluación *in vitro* de diferentes caracteres relacionados con la formación de órganos a partir de meristemos. Además, se han evaluado caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo y reproductivo en el invernadero. En este sentido, y por lo que respecta al desarrollo vegetativo, el fenotipado se ha centrado en el efecto del silenciamiento sobre la arquitectura de la planta y el desarrollo de órganos foliares. En lo que concierne al desarrollo reproductivo, se ha determinado el efecto del silenciamiento sobre la tasa de cuajado, el calibre y el número de lóculos del fruto y la producción.

### Palabras clave

Tomate; *CLAVATA3*; *FASCIATED INFLORESCENCE*; fruto; producción

## Impact of *CLAVATA3* and *FASCIATED INFLORESCENCE* gene silencing on bilocular or multilocular tomato varieties

### Abstract

Floral transition involves the transformation of stem apical meristem (SAM), which changes its vegetative identity to an inflorescence meristem, also giving rise to secondary inflorescence meristems that finally transform to floral meristems. Primordia of the floral organs start forming on the flanks of floral meristems and after successive division and cellular expansion cycles, they give rise to flowers. Among factors determining final fruit size in tomato, cell division rate it's included but number of carpels it's the main accountable for final fruit size. This trait is determined by floral meristem size, whose regulation involves a negative-feedback loop in which the extracellular signalling pathway formed by *CLAVATA* (*CLV*) and *WUSCHEL* (*WUS*) genes plays a big role. Genetic analysis of mutants and reverse genetics studies have revealed the genetic basis and molecular mechanism of *CLAVATA*-*WUSCHEL* pathway. For example, mutations at *CLV* genes lead to an increase in floral meristem size through *WUS* expression domains expansion, which gives rise to flowers with larger number of carpels. Tomato mutants lacking function of *FASCIATED INFLORESCENCE* (*FIN*) gene, which codifies a hydroxyproline O-arabinosyltransferase, show *clv*-like phenotypes.

In this work, impact of silencing *CLV3* and *FIN* genes on two tomato varieties, Moneymaker and p73, has been evaluated. This varieties develop, respectively, bilocular or multilocular fruits. To address the objectives of this work, single copy transgenic progenies were previously selected. Based on the role played by these genes on meristematic activity regulation, an *in vitro* evaluation of different traits related to organ formation from meristems has been made. Moreover, traits involved in vegetative and reproductive development have been evaluated at greenhouse. Therefore, for vegetative development, phenotyping has been focused on the effect of silencing on plant architecture and foliar organs development. With respect to reproductive development, the effect of silencing has been evaluated as curdling rate, fruit size, locule number and production.

### Key words

Tomato; *CLAVATA3*; *FASCIATED INFLORESCENCE*; fruit; production



# 1. INTRODUCCIÓN

---



# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. Estructura del SAM a nivel anatómico y funcional

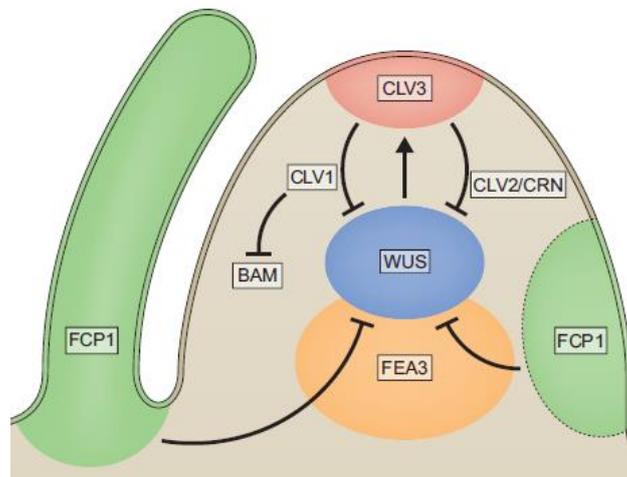
El desarrollo y crecimiento mediante la formación de nuevos órganos ocurre como consecuencia de estructuras específicas que poseen células pluripotentes denominadas meristemos (Sicard *et al.*, 2008). Al inicio de la embriogénesis se establecen los dos meristemos principales que van a generar el eje 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.

El SAM se puede analizar de dos formas, a nivel anatómico-histológico o desde un punto de vista funcional (Bowman y Eshed, 2000). Por lo que respecta al estudio anatómico-histológico, en la mayoría de las dicotiledóneas, en el SAM se pueden diferenciar 3 capas celulares, a saber, la capa epidérmica más externa (L1), la capa subepidérmica (L2) y el corpus (L3). La capa L1 da lugar a la epidermis de los brotes vegetativos, hojas y flores; la capa L2 es el origen del tejido mesodérmico y las células germinales; y la capa L3 es la responsable de generar los tejidos vasculares (Fletcher y Meyerowitz, 2000). A nivel funcional, en el SAM se distinguen tres dominios principales: la zona central (ZC), la zona periférica (ZP) y la zona medular (ZM). La ZC actúa como un reservorio de células indiferenciadas para las ZP y ZM. La ZP es la región de transición del SAM, donde las células procedentes de la ZC adquieren especificidad para formar los primordios de órganos laterales y meristemos axilares. La ZM está implicada en la formación de los tejidos internos del tallo (Fletcher, 2002). Estos dominios funcionales quedan definidos por señales específicas procedentes del centro organizador (CO), un pequeño grupo de células situadas en la base de la ZC cuya función es regular la división celular dentro de las distintas zonas. En la ZC, las células se dividen lentamente manteniéndose indiferenciadas, mientras que en las ZP y ZM proliferan rápidamente para completar su diferenciación durante la organogénesis (Soyars *et al.*, 2016).

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. 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. 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.

## 1.2. Regulación génica de la actividad del SAM a través de la vía CLAVATA/WUSCHEL

El tamaño del meristemo apical se mantiene constante merced a la acción combinada de *WUS* y *CLV3* (**Figura I1**). Esta ruta, descubierta a través del análisis de mutantes de *Arabidopsis*, se autorregula mediante un sistema de retroalimentación negativa que involucra al factor de transcripción *WUS*, que promueve la proliferación, y al péptido señal *CLV3*, promotor de diferenciación (Brand *et al.*, 2000). El péptido señal *CLV3* (Clark *et al.*, 1995) es secretado por las células de la zona central y se difunde por el centro organizador subyacente donde es percibido por receptores quinasas cuya señalización da lugar a la inhibición de la expresión de *WUS* (Schoof *et al.*, 2000). La señal de *CLV3* es transmitida a través de dos vías paralelas (**Figura I1**). Una de ellas implica la unión directa al receptor quinasa *CLV1*, mientras que en la segunda ruta, independiente de la anterior, la señal es transmitida por el heterodímero *CLV2*/*CORINE* (*CRN*), que actúa como co-receptor de *CLV3* (Müller *et al.*, 2008; Bleckmann *et al.*, 2010; Somssich *et al.*, 2016). A su vez, la proteína *WUS*, sintetizada en las células del centro organizador, migra a las células adyacentes donde se une al promotor de *CLV3* activando su transcripción (**Figura I1**). De este modo, *WUS* limita su propia actividad a través de *CLV3* (Yadav *et al.*, 2011).



**Figura I1.** Ruta de retroalimentación CLV/WUS en el SAM (Somssich *et al.*, 2016).

La base genética y el mecanismo molecular de la ruta CLV/WUS se han empezado a conocer gracias al análisis de mutantes y a estudios de genética reversa. Los mutantes *wus* son incapaces de mantener la identidad y el tamaño de los meristemos, lo que promueve el desarrollo defectuoso de brotes, flores y frutos; al igual que la sobreexpresión de *CLV3* (Brand *et al.*, 2000). Por el contrario, las mutaciones en los genes *CLV* producen meristemos de mayor tamaño debido a la imposibilidad de restringir la expresión de *WUS* (Schoof *et al.*, 2000). Los genes de la ruta CLV/WUS se expresan de

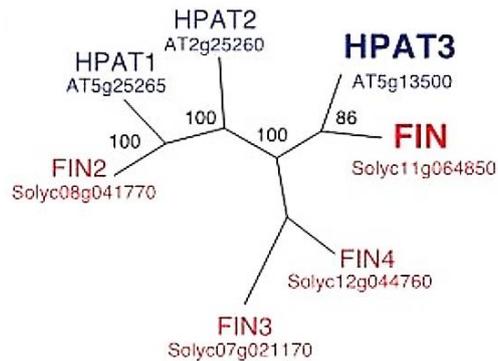
manera similar en el meristemo floral y sus mutaciones causan alteraciones similares a las observadas en el SAM.

Por lo que concierne al meristemo de inflorescencia (IM), los mutantes de tomate que prolongan la identidad del IM durante más tiempo desarrollan inflorescencias ramificadas, así como un aumento del número de carpelos que finalmente da como resultado el desarrollo de frutos más grandes. Así, el mutante *fasciated inflorescence (fin)* exhibe mayor ramificación de las inflorescencias, y desarrolla frutos de mayor tamaño consecuencia de un mayor número de carpelos.

### 1.3. Los genes *CLV3* y *FIN*

El gen *CLV3* codifica para una pequeña proteína extracelular que se expresa en las células pluripotentes de los meristemos vegetativo y floral (Brand *et al.*, 2000). Esta proteína cuenta con 96 aminoácidos, de los cuales 18 constituyen la región N-terminal que es hidrofóbica y parece actuar como péptido señal dirigiendo la proteína a la vía secretora / de secreción (Fletcher, 1999). Dado que no existen otras regiones hidrofóbicas, se considera que *CLV3* es una proteína soluble (Rojo *et al.*, 2002). La expresión del mRNA de *CLV3* se da en las capas epidérmicas y subepidérmicas de células pluripotentes tanto de meristemo vegetativo como floral, desde las que se desplaza para interactuar con *CLV1* y *CLV2/CRN* (a través de las dos vías) y activar la ruta *CLV* (Fletcher y Meyerowitz, 2000; Rojo *et al.*, 2002; Fletcher, 1999).

Respecto al gen *FIN*, codifica para un homólogo de la familia de proteínas hidroxiprolina O-arabinosiltransferasas (HPAT) que se identificó en *Arabidopsis* (Ogawa-Ohnishi *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015). Estas proteínas catalizan la transferencia de l-arabinosa al grupo hidroxilo de los residuos de hidroxiprolina (Hyp) (Ogawa-Ohnishi *et al.*, 2013). Esta modificación se realiza principalmente sobre glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, especialmente sobre extensinas, pero también en péptidos señal que son secretados, como por ejemplo *CLV3* (McAlister *et al.*, 2016; Ohyama *et al.*, 2009). Más concretamente, *FIN* es uno de los cuatro genes ortólogos a los genes de *HPAT* de *Arabidopsis*, siendo *HPAT3* el más parecido a *FIN* (Figura I2).



**Figura 12.** Árbol filogenético de la familia *FIN/HPAT* a partir de secuencias completas que codifican para proteínas putativas. Se ilustran en color rojo los genes de tomate y en color azul los de *Arabidopsis* (Xu *et al.*, 2015).

#### 1.4. Origen y genes implicados en el calibre del fruto de tomate

Los orígenes y primeros pasos de la domesticación del tomate son dudosos, aunque parece que el centro de origen es la región occidental de Sudamérica que se extiende desde Ecuador hasta Chile, donde existe una mayor diversidad fenotípica. La presencia de esta especie más al norte (i.e. México) parece responder a una expansión posterior, posiblemente antrópica.

En su área de distribución, desde las Islas Galápagos hasta los valles andinos, las variedades silvestres han sido capaces de crecer tanto a nivel del mar de las costas del Pacífico como en las regiones andinas que se encuentran a 3300 metros sobre el nivel del mar, incluyendo los valles de esta cordillera donde se produjeron fenómenos de aislamiento geográfico. Tal variedad de ecosistemas en los que ha sido capaz de crecer, que incluye diferentes condiciones edafológicas y especialmente climáticas en lo que respecta a la precipitación anual y la temperatura, explica la amplia diversidad que esta especie presenta en estado silvestre (Peralta y Spooner, 2006; Nakazato *et al.*, 2010).

El momento y el lugar en el que se produjo la domesticación del tomate es todavía objeto de controversia a falta de estudios tanto arqueológicos como filogenéticos en los cuales se tengan



Esta acuarela de mediados del siglo XVI es la representación más antigua de una planta de tomate en Europa y forma parte de los materiales inéditos de Leonhard Fuchs (1542).

Fuente: Peralta *et al.* (2008).

presentes todos los cultivares americanos y las variedades silvestres. Dos son las hipótesis que cuentan hoy día con mayor aceptación: la hipótesis peruana y la mexicana.

DeCandolle (1886) y otros autores posteriormente establecieron el origen de la domesticación del tomate en Perú, de donde creyeron procedían los primeros ejemplares que llegaron a Europa debido a que en el Viejo Mundo fueron llamados a principios del siglo XVII "*mala peruviana*" y "*pomi del Peru*" y a que en esa región se encontraba el mayor número de variedades silvestres. De ser así, su domesticación debió ocurrir muy poco tiempo después de la llegada de los europeos al continente ya que no hay registro sobre el cultivo del tomate en la etapa precolombina, no existe un término para identificar a la planta en ninguna de las lenguas nativas y no se conocen representaciones artísticas de la planta al contrario de lo que ocurre con otros vegetales de la región (Peralta y Spooner, 2006).

La hipótesis alternativa, desarrollada por Jenkins (1948), señala un origen mexicano del cultivo atendiendo a varios testimonios europeos de la presencia del vegetal en México a finales del siglo XVI, a la existencia de un mayor número de cultivares de tomate en México que en Perú y al origen etimológico de la palabra *tomate* (que procedería del término "*tomatl*", el nombre para la planta en lengua nahua). Las citas del vegetal como "*tumatle ex Themistitan*" en Guilandini (1572) donde Jenkins identificó en topónimo Themistitan con Tenochtitlan, capital del imperio azteca, demostrarían para el autor el origen precolombino del cultivo en esta región de Norteamérica (Peralta y Spooner, 2006). Para Jenkins, las plantas cultivadas en México debían proceder de especímenes de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* originarios del Perú (Labate *et al.*, 2007).

Parece ser que, en 1521, tras la llegada de los europeos a México, ya existían tomates cultivados que se utilizaban, junto con diversas variedades de *Capsicum*, para hacer salsas (Labate *et al.*, 2007). En 1577, Fray Bernardino de Sahagún, en su libro *Historia general de las cosas de Nueva España*, señala la presencia en los mercados mexicanos de siete especies vegetales cuyos nombres derivarían directamente del término *tomatl*. No obstante, sólo uno de ellos, el *xitomatl* o jitomate, se corresponde con la especie *Solanum lycopersicum* que según parece no era tan popular en la cultura culinaria azteca como los cultivares de *Physalis* (Díez y Nuez, 2008).

A pesar de que ya se consumían en México, los primeros tomates que llegaron a Europa en la década de 1540 fueron cultivados como plantas ornamentales debido a que se consideraba que todas las partes de la planta eran venenosas y no pasaban de ser más que curiosidades de jardín (Peralta y Spooner, 2000). En el sur de Europa, la planta se adaptó bien al clima mediterráneo y, aunque se conocen citas muy tempranas en Centroeuropa, fue precisamente en el sur del continente donde comenzó a consumirse por primera vez a mediados del siglo XVII (Peralta y Spooner, 2006). Fue a partir de la popularización de su uso culinario cuando comenzó la expansión del cultivo. El tomate

fue rápidamente distribuido por el mundo llegando de la mano de los españoles al Caribe y a Filipinas, y desde allí a Asia a finales del siglo XVI. El cultivo fue asimismo introducido en África a partir de las colonias portuguesas de Mozambique y Angola, y en Oriente Próximo a través de Turquía (Díez y Nuez, 2008). El tomate ya aparece en un libro de recetas de cocina del Reino Unido en 1752 desde donde debió pasar a sus colonias norteamericanas. La primera cita del cultivo en los Estados Unidos de América es de 1781 y en el año 1863 ya existían 23 cultivares diferentes (Labate *et al.*, 2007).

Mientras que las variedades silvestres de tomate presentan una gran diversidad genética y fenotípica, las variedades cultivadas se han visto diezgadas por cuellos de botella derivados de la propia domesticación (Miller y Tanksley, 1990). El tamaño y forma del fruto fueron los primeros rasgos, junto con el rendimiento, ligados a este proceso de domesticación (van der Knaap y Tanksley, 2001; Tanksley, 2004). De hecho, se han identificado cerca de 30 loci de carácter cuantitativo (QTLs) asociados al tamaño del fruto (Grandillo *et al.*, 1999) de los cuales cinco (*fw1.1*, *fw5.2*, *fw7.2*, *fw12.1* y *lcn12.1*) contribuyeron significativamente a la transición desde *S. pimpinellifolium* a *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Lin *et al.*, 2014). Posteriormente, en una segunda fase, fundamentada en programas de mejora genética, cabe destacar el papel de los QTLs *fw2.2* y *fw3.2* como responsables del aumento del tamaño de fruto en las variedades actuales de *S. lycopersicum* (Chakrabarti *et al.*, 2013; Azzi *et al.*, 2015).

Sin embargo, el número final de cavidades o lóculos del fruto, que se corresponde con el número de carpelos que se desarrollan en el gineceo, juega un papel aún más relevante que la división celular. Así, se ha descrito que el número de lóculos es responsable del 50% de la variación en el tamaño del fruto (Tanksley, 2004). Las principales mutaciones que ocasionan un mayor número de carpelos en el ovario durante la organogénesis floral y, por ende, un mayor número de lóculos en el fruto son *locule number* (*lc*), una mutación de ganancia de función asociada a dos polimorfismos tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) presentes en una región reguladora del gen de tomate ortólogo al gen *WUSCHEL* (*WUS*) de *Arabidopsis* (Muños *et al.*, 2011), y *fasciated* (*fas*), localizada en el promotor del gen ortólogo de *CLAVATA3* (*CLV3*) de *Arabidopsis* (Xu *et al.*, 2015). Las funciones de *LC* y *FAS* se requieren en fases tempranas del desarrollo floral, donde regulan la forma del fruto junto con los genes *OVATE* y *SUN*, que regulan su elongación (Rodríguez *et al.*, 2011; Azzi *et al.*, 2015).

## 2. OBJETIVOS

---



## 2. OBJETIVOS

---

El principal objetivo de este Trabajo Final de Máster ha sido evaluar el impacto del silenciamiento génico de *CLAVATA3 (CLV3)* y *FASCIATED INFLORESCENCE (FIN)* en variedades de tomate de fruto bilocular (i.e. Moneymaker) o multilocular (i.e. p73). Los objetivos concretos han sido los siguientes:

1. Identificar progenies transgénicas de simple copia.
2. Caracterizar *in vitro* el impacto del silenciamiento de *CLV3* y *FIN* sobre la respuesta morfogénica y el desarrollo de plántulas y plantas axénicas de Moneymaker y p73.
3. Caracterizar en invernadero el impacto del silenciamiento de *CLV3* y *FIN* sobre los caracteres vegetativos y reproductivos de las plantas transgénicas.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1 Material vegetal

Como material vegetal de partida se han empleado 3 líneas transgénicas de tomate segregantes (generación TG2) que tienen silenciado el gen *CLAVATA3 (CLV3)*, dos de ellas en el fondo genético Moneymaker y una en p73, y 2 líneas transgénicas de tomate segregantes (generación TG2) que tienen silenciado el gen *FASCIATED INFLORESCENCE (FIN)*, dos de ellas en el fondo genético Moneymaker y una en p73. El cultivar Moneymaker, introducido por el inglés F. Stonor a mitad del siglo pasado, es muy popular debido a que produce frutos, generalmente biloculares, 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. El cultivar p73 es una línea de tomate para consumo fresco, de crecimiento indeterminado, cedida amablemente por la Dra. M<sup>a</sup> José Díez. Este cultivar porta la mutación *locule number (lc)*, y por ello desarrolla frutos con más de dos lóculos.

### 3.2 Técnicas básicas de cultivo *in vitro*

#### 3.2.1 Esterilización de 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 la 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 se sellan con parafilm y se mantienen en oscuridad a 28°C durante 48 horas. 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 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 y de hipocótilo. 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 y se cultivan con el envés en contacto con el medio de cultivo. Respecto a los hipocótilos, se obtienen explantes de aproximadamente 0,5 cm que se cultivan en posición horizontal. 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, compuesto por solución mineral MS (*Duchefa Biochemie*), 30 g/L de sacarosa, 0.1 g/L inositol, 10 ml de vitaminas SH y la combinación de reguladores de crecimiento. Esta combinación de reguladores (4.0 mg/L de ácido indolacético + 4.0 mg/L de kinetina + 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. 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 condiciones de incubación son las mismas que las descritas en el apartado 3.2.2.

### 3.2.5 Obtención de plantas axénicas

Para el enraizamiento de las plantas axénicas, los brotes se cultivan en el medio MB2 compuesto por solución mineral MS (*Duchefa Biochemie*), 20 g/L de sacarosa, 0.1 g/L inositol, y 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. 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 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. Las condiciones de incubación de las plantas axénicas son las descritas en el apartado 3.2.2.

#### 3.2.6 Obtención de plántulas axénicas

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) que contienen medio MB2 descrito en el apartado 3.2.5. 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<sup>o</sup> C durante 30 minutos. Las condiciones de incubación de las plantas axénicas son las descritas en el apartado 3.2.2.

#### 3.2.7 Análisis de la resistencia-sensibilidad a la kanamicina

El análisis de la resistencia o sensibilidad a la kanamicina de las plantas se analiza de dos maneras: 1) En plántulas procedentes de la germinación de semilla. Tras la esterilización de las semillas (apartado 3.2.1) éstas se transfieren a recipientes que contienen medio MG (ver apartado 3.2.2) suplementado con 100 mg/L de kanamicina. 2) A partir de explantes de hipocótilo. En este caso, a los 7 días de la germinación de la semilla (apartados 3.2.1 y 3.2.2), los explantes de hipocótilo se transfieren a medio organogénico (apartado 3.2.4) suplementado con 100 mg/L de kanamicina. En ambos casos, la sensibilidad a la kanamicina se traduce en inhibición del crecimiento (desarrollo de la plántula o generación de callo a partir de los extremos del hipocótilo). Las condiciones de incubación son las mismas que las descritas en el apartado 3.2.2.

### **3.3. Caracterización del desarrollo vegetativo y la producción**

Para la caracterización del desarrollo vegetativo y la producción se cultivaron 60 plantas TG2 (12 plantas de cada línea de silenciamiento, ver apartado 3.1) en el invernadero. Las semillas, tras su esterilización y germinación (apartados 3.2.1 y 3.2.2), se transfirieron a macetas pequeñas (polietileno negro Ø: 9 cm, *Os-plastic*) con fibra de coco estéril (fibra de ¾ de *Cocoterra*). A los 20 días, las plántulas se trasplantaron a una maceta de mayor calibre (polietileno negro Ø: 28 cm, capacidad 12 L, *Maceflor*). Las necesidades de riego se cubrieron mediante fertirrigación con solución nutritiva, colocando 2 goteros por maceta y aplicando 4-8 riegos diarios de 1-2 minutos (el número y duración de los riegos varió con el estadio de desarrollo de la planta, incrementándose el número y

la extensión de los mismos en función de los requerimientos hídricos). La composición de la solución nutritiva suministrada mediante el agua de riego es la siguiente: 0,15 g/L de  $\text{PO}_4\text{H}_3$ , 0,82 g/L de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,20 g/L de  $\text{NO}_3\text{K}$ , 0,35 g/L de  $\text{SO}_4\text{K}_2$ , 0,24 g/L de  $\text{SO}_4\text{Mg}$  y 0,1 g/L de BMX (micronutrientes). El cultivo se realizó en un invernadero tipo capilla en las siguientes condiciones de cultivo: i) fotoperiodo: 16 horas luz / 8 horas oscuridad, ii) temperatura:  $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  (diurna),  $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  (nocturna), humedad relativa: 45-65% (diurna), 75-90% (nocturna), y iii) luz natural suplementada con lámparas de mercurio de 400 w para mantener un fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). La poda se realizó a una guía, eliminando todos los brotes laterales cada 7 días y dejando únicamente el tallo principal. Se realizaron tratamientos fitosanitarios según las recomendaciones de cada fabricante contra ácaros, mosca blanca, enfermedades fúngicas y tuta absoluta desde el momento en el que se detectaba su aparición.

Respecto a caracteres del desarrollo vegetativo, se evaluó el número de fitómeros hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias, así como distancia hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias en las seis primeras inflorescencias. Respecto al desarrollo reproductivo, se evaluaron los siguientes parámetros: número de 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 determinó 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 plantas con idéntica configuración transgénica permitió determinar la tasa de cuajado de cada 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 plantas con idéntica configuración transgénica permitió determinar la producción por línea.

### **3.4. Análisis genético**

Para llevar a cabo el análisis genético, se contabiliza 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 analizan mediante el test  $\chi^2$ , 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.

### **3.5. 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. RESULTADOS

### 4.1. Resultados preliminares

En nuestro laboratorio se han obtenido plantas transgénicas con los genes *FASCIATED INFLORESCENCE (FIN)* y *CLAVATA3 (CLV3)* silenciados mediante interferencia por RNA (Ri) en las variedades de tomate p73 y Moneymaker en el contexto de un proyecto relacionado con el estudio de genes que regulan el tamaño del fruto de tomate. Estas plantas transgénicas (TG1) se evaluaron en invernadero para los siguientes caracteres: número de frutos por planta, peso medio del fruto, diámetro del fruto y número de lóculos por fruto (**Tablas R1a y R1b**). Entre estas TG1, algunas líneas destacaron por un incremento en los valores de los caracteres fenotipados con respecto al wild type (WT), lo que indicaba que el silenciamiento de estos genes podría tener implicaciones interesantes. Con el objetivo de realizar un estudio más detallado, en este trabajo de investigación se ha realizado una evaluación de algunas progenies TG2.

**Tabla R1a.** Caracterización de frutos en plantas transgénicas (TG1) de tomate p73 con los genes *FIN* (Ri-*FIN*) y *CLV3* (Ri-*CLV3*) silenciados.

Línea	Nº de frutos	Ø fruto (cm)	Nº lóculos	Peso (g)
p73	31	5.73 ± 0.73	4.71 ± 1.60	106.38 ± 31.64
Ri- <i>FIN</i> -31	14	5.45 ± 0.99	5.57 ± 1.74	84.68 ± 36.95
Ri- <i>FIN</i> -38.1	3	4.40 ± 0.35	4.33 ± 0.58	42.92 ± 15.20
Ri- <i>FIN</i> -39	4	4.53 ± 0.49	4.50 ± 0.58	42.85 ± 17.26
Ri- <i>FIN</i> -47.2	6	5.28 ± 0.43	3.17 ± 0.41	56.16 ± 29.87
Ri- <i>CLV3</i> -30	5	5.10 ± 0.25	4.40 ± 0.55	78.94 ± 16.25
Ri- <i>CLV3</i> -33	9	6.04 ± 0.73	6.00 ± 0.87	108.08 ± 42.86
Ri- <i>CLV3</i> -38	2	6.75 ± 0.92	8.50 ± 0.71	113.81 ± 19.50
Ri- <i>CLV3</i> -41	2	8.05 ± 0.64	9.50 ± 0.71	157.35 ± 35.88

Datos expresados como promedio ± desviación típica

**Tabla R1b.** Caracterización de frutos en plantas transgénicas (TG1) de tomate Moneymaker con los genes *FIN* (Ri-*FIN*) y *CLV3* (Ri-*CLV3*) silenciados.

Línea	Nº de frutos	Ø fruto (cm)	Nº lóculos	Peso (g)
MM	23	4.20 ± 0.52	2.04 ± 0.21	47.12 ± 15.26
Ri- <i>FIN</i> -7	7	4.59 ± 0.46	2.86 ± 0.69	54.45 ± 16.00
Ri- <i>FIN</i> -18	12	4.07 ± 0.51	3.58 ± 1.16	38.03 ± 18.77
Ri- <i>FIN</i> -19	10	3.30 ± 0.23	2.90 ± 0.57	18.97 ± 5.66
Ri- <i>CLV3</i> -3	16	4.82 ± 0.69	3.38 ± 1.59	64.30 ± 21.90
Ri- <i>CLV3</i> -4	14	5.14 ± 1.09	4.50 ± 1.02	69.26 ± 35.70
Ri- <i>CLV3</i> -16	9	4.50 ± 0.26	2.78 ± 0.44	54.23 ± 9.92
Ri- <i>CLV3</i> -24	14	5.10 ± 0.63	7.00 ± 1.11	56.10 ± 22.30

Datos expresados como promedio ± desviación típica.

#### 4.2. Identificación de progenies de simple copia

Para la identificación de progenies de simple copia, se sembraron semillas procedentes de la autofecundación de las plantas transgénicas en un medio de cultivo suplementado con kanamicina. Tras la germinación, las plántulas se dejaron crecer hasta el momento en el que fue posible evaluar la resistencia o sensibilidad a la kanamicina (i.e. en torno a 30 días). Transcurrido este periodo de tiempo, las plantas resistentes y sensibles a la kanamicina son claramente distinguibles. En efecto, a diferencia de lo que ocurre en las plantas sensibles a la kanamicina, las resistentes son capaces de desarrollar tanto la parte aérea como el sistema radicular. Las sensibles, sin embargo, no son capaces de desarrollar raíces laterales ni hojas verdaderas. Además, el hipocótilo suele exhibir una pigmentación rojiza consecuencia de la acumulación de antocianos. Estos caracteres hacen, como se ha comentado anteriormente, que ambos tipos de plántulas (i.e. resistentes y sensibles a la kanamicina) se distingan muy fácilmente.

Por lo que respecta a los resultados, la mayor parte de las líneas segregaron para una copia (segregación 3:1), tres líneas segregaron para dos copias (segregación 15:1), dos líneas exhibieron

una distorsión de la segregación y otras dos líneas fueron completamente sensibles a la kanamicina (**Tabla R2**).

**Tabla R2.** Segregación para el carácter resistencia a la kanamicina en distintas líneas Ri-*FIN* y Ri-*CLV3* de p73 y Moneymaker (MM).

Variedad	Gen silenciado	Línea	Resistencia a kanamicina		Segregación	$\chi^2$ <sup>a</sup>
			Km <sup>R</sup>	Km <sup>S</sup>		
P73	<i>FIN</i>	38.1	46	19	3:1	0,62
		47.2	0	27	-	-
		31	40	11	3:1	0,32
		39	38	12	3:1	0,03
	<i>CLV3</i>	30	23	23	1:1	0
		38	40	17	3:1	0,71
		41	49	4	15:1	0,15
		33	23	10	3:1	0,49
MM	<i>FIN</i>	18	32	12	3:1	0,12
		2	25	15	3:1	3,33
		19	46	17	3:1	0,13
		7	40	4	15:1	0,61
	<i>CLV3</i>	24	41	4	15:1	0,53
		16	0	48	-	-
		4	31	14	3:1	0,90
		3	14	40	1:3	1,83

<sup>a</sup> El valor calculado representa el ajuste de los datos a la segregación esperada correspondiente ( $P > 0,05$ ;  $\chi^2$ , 1 g.l. = 3,84)

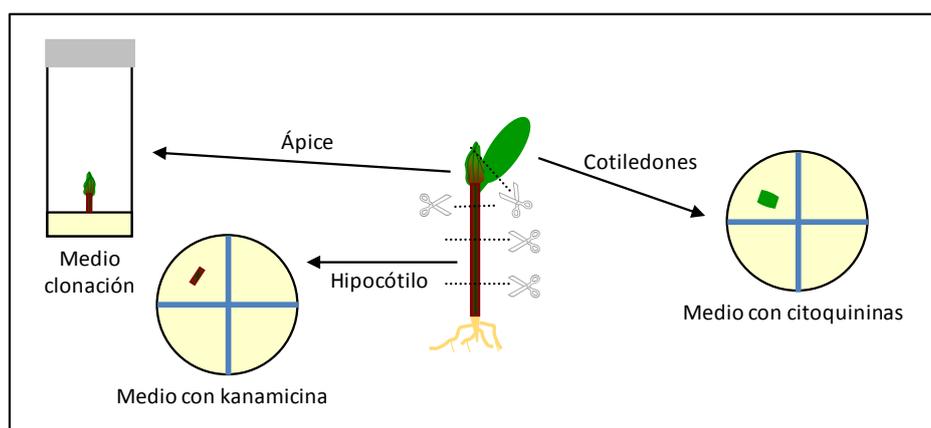
Por ejemplo, la segregación de la línea *CLV3*-30 de p73 se ajustó a un patrón 1:1. Este resultado podría estar ocasionado por el silenciamiento del alelo transgénico en homocigosis, o porque el transgén provoca la letalidad de uno de los gametos. La línea *CLV3*-3 de Moneymaker se ajustaba a una segregación 1:3, es decir, 1 planta resistente y 3 plantas sensibles. En este caso, los resultados sugieren fenómenos de silenciamiento génico post-transcripcional. En este sentido, si la línea tuviese dos o más copias del T-DNA, esta segregación podría explicarse sobre la base del silenciamiento génico en plantas con dos o más copias del transgén.

Cabe mencionar las líneas en las que solo se obtuvieron plantas sensibles a kanamicina, *FIN-47.2* de p73 y *CLV3-16* de Moneymaker. Estas líneas podrían ser escapes del proceso de transformación, es decir, podrían no contener el alelo transgénico. De hecho, esta hipótesis concuerda con los resultados de la caracterización de frutos en plantas TG1, recogida en las **Tablas R1a y R1b**, en las que se puede observar que las dos líneas mencionadas mostraron fenotipo WT para los caracteres de interés.

Sobre la base del análisis de segregación (**Tabla R2**) y los caracteres de fruto evaluados en las plantas TG1 (**Tablas R1a y R1b**), se seleccionaron las líneas más interesantes. En concreto, se seleccionaron las líneas *FIN-31* y *CLV3-38* de p73 y *FIN-18*, *CLV3-4* y *CLV3-24*, de Moneymaker. El objetivo era evaluar una línea de *FIN* y otra de *CLV3* de cada variedad, todas ellas de simple copia. Sin embargo, en el caso concreto de la variedad Moneymaker con el gen *CLV3* silenciado, se seleccionó una línea adicional (i.e. *CLV3-24*) que, si bien presentaba dos copias del transgén, el fenotipo TG1 mostraba un promedio de número de lóculos por fruto notablemente mayor al de las plantas WT (**Tabla R1a**).

#### 4.3. Caracterización fenotípica de las líneas de silenciamiento en condiciones de cultivo *in vitro*

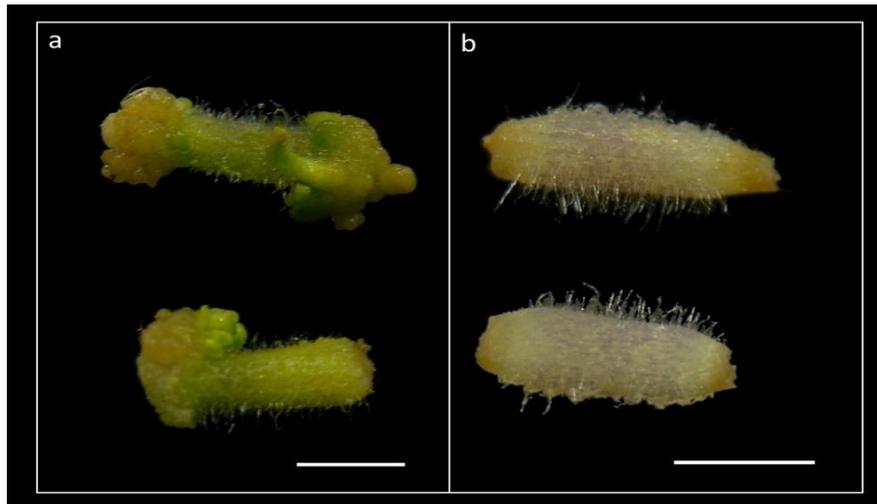
En condiciones de cultivo *in vitro*, se caracterizó tanto el fenotipo en estadio de plántula (procedentes de la germinación de semilla), como de planta axénica (i.e. planta con raíz adventicia). También se evaluó la respuesta morfo genética a partir de explantes de cotiledón. Además, para comparar los resultados de las plantas con o sin T-DNA, se evaluó la resistencia o sensibilidad a la kanamicina empleando explantes de hipocótilo (**Figura R1**).



**Figura R1.** Caracterización *in vitro*. A partir de una plántula de 7-10 días, se extrajeron: i) 2 explantes de cotiledón para evaluar la respuesta morfo genética en medio con citoquininas, ii) 1-2 explantes de hipocótilo para evaluar la resistencia/sensibilidad a la kanamicina de esa planta, y iii) el ápice para evaluar el crecimiento de la planta axénica.

#### 4.3.1 Identificación de plantas transgénicas

Como se comentaba anteriormente, la identificación de plantas sensibles y resistentes a kanamicina se realizó utilizando los explantes de hipocótilo. Los explantes resistentes exhibían color verde y una pequeña formación de callo y/o brotes en las zonas de corte, mientras que los explantes sensibles exhibían color blanco o morado y no se apreciaba el desarrollo de callo (**Figura R2**). Los resultados de este ensayo se utilizaron en experimentos posteriores para poder identificar las plantas transgénicas.



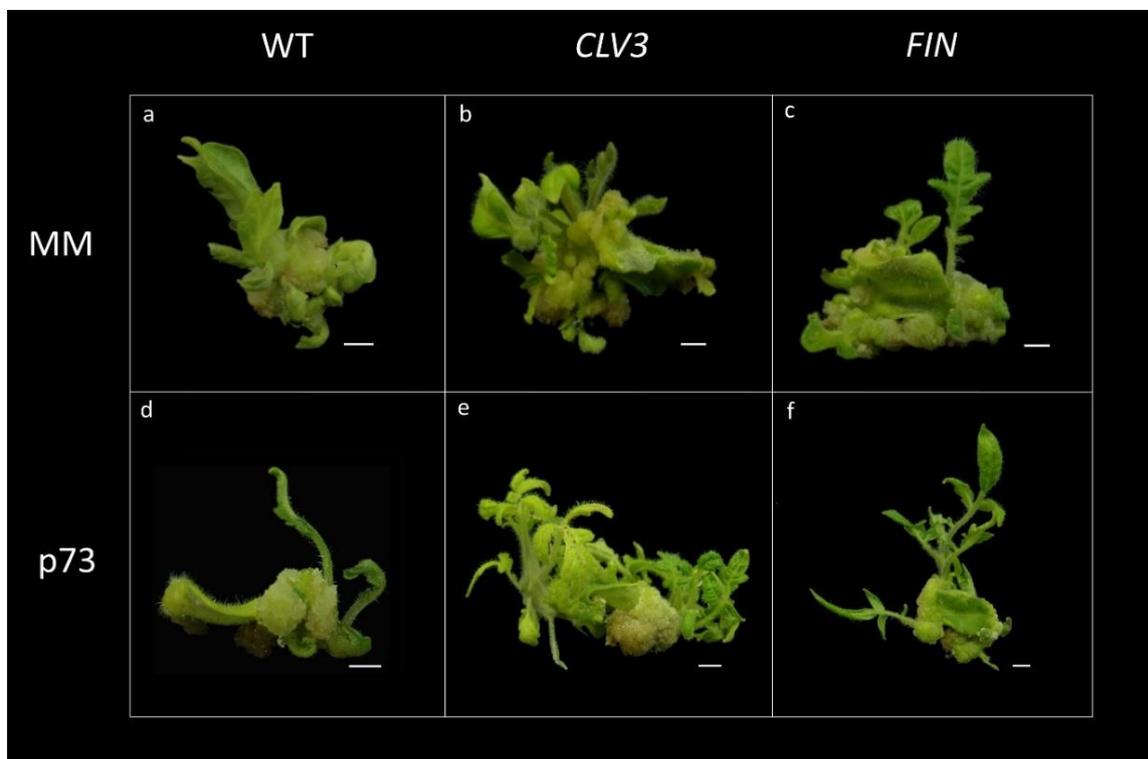
**Figura R2.** Identificación de plantas transgénicas a partir de explantes de hipocótilo. a) Explantes de hipocótilo procedentes de una planta transgénica, resistente a kanamicina. b) Explantes de hipocótilo obtenidos de una planta wild type, sensible a kanamicina. Escala de barras: 0,5 cm.

#### 4.3.2 Caracterización de la respuesta morfogénica

La caracterización de la respuesta morfogénica se llevó a cabo mediante el cultivo de explantes de cotiledón sobre el medio que se emplea rutinariamente en el laboratorio para inducir organogénesis (ver apartados 3.2.3 y 3.2.4 de Materiales y Métodos). Los resultados del experimento de identificación de plantas transgénicas con explantes de hipocótilo permitían saber si los cotiledones procedían de una planta resistente o sensible a la kanamicina.

En términos generales, los cotiledones de las plantas resistentes a la kanamicina (i.e. plantas portadoras de las construcciones de silenciamiento de *FIN* y *CLV3*) exhibían mayor respuesta morfogénica que los cotiledones de las plantas sensibles a la kanamicina (**Figura R3**). Respecto al efecto de cada uno de los genes, las plantas transgénicas con el gen *CLV3* silenciado exhibían mayor respuesta morfogénica que las que tenían silenciado *FIN*. Respecto al efecto de los genes en cada una de las variedades, se vio que la respuesta morfogénica en las plantas transgénicas de p73 fue

mayor que la de las plantas transgénicas de MoneyMaker (i.e. *FIN*-p73 vs *FIN*-MM o *CLV3*-p73 vs *CLV3*-MM). Estos resultados parecen indicar que el silenciamiento de estos genes promueve un incremento de la respuesta morfogénica en las dos variedades de tomate.



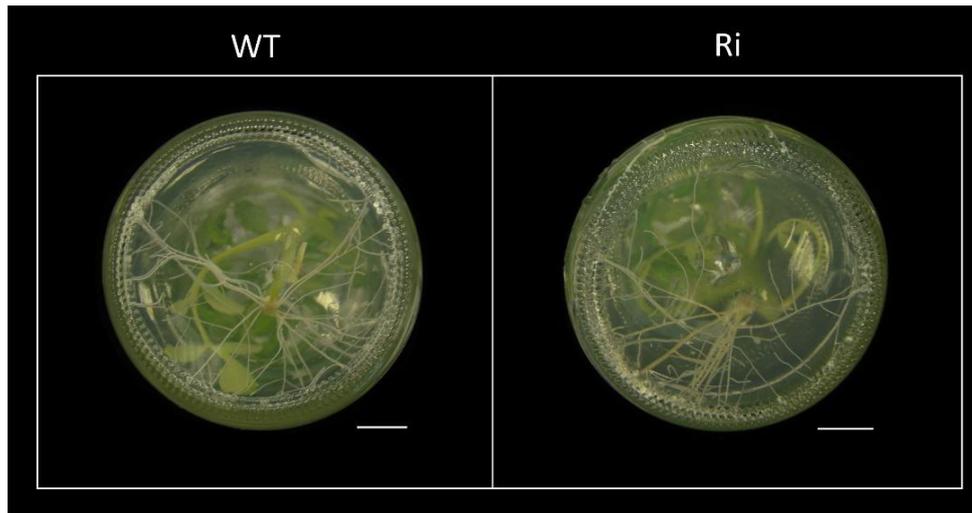
**Figura R3.** Respuesta morfogénica en explantes de cotiledón de plantas WT de MoneyMaker (a) y p73 (d), de plantas transgénicas Ri-*CLV3* de MoneyMaker (b) y p73 (e), y de plantas transgénicas Ri-*FIN* de MoneyMaker (c) y p73 (f).

Escala de barras: 0,5 cm.

#### **4.3.3 Caracterización del fenotipo de las plantas axénicas: crecimiento de la parte aérea y desarrollo radicular adventicio**

Para evaluar el fenotipo de planta axénica, los ápices de las plántulas se cultivaron sobre un medio básico (i.e. sin suplemento de hormonas). A los 30 días de cultivo se caracterizó el desarrollo de la parte aérea y el desarrollo radicular adventicio.

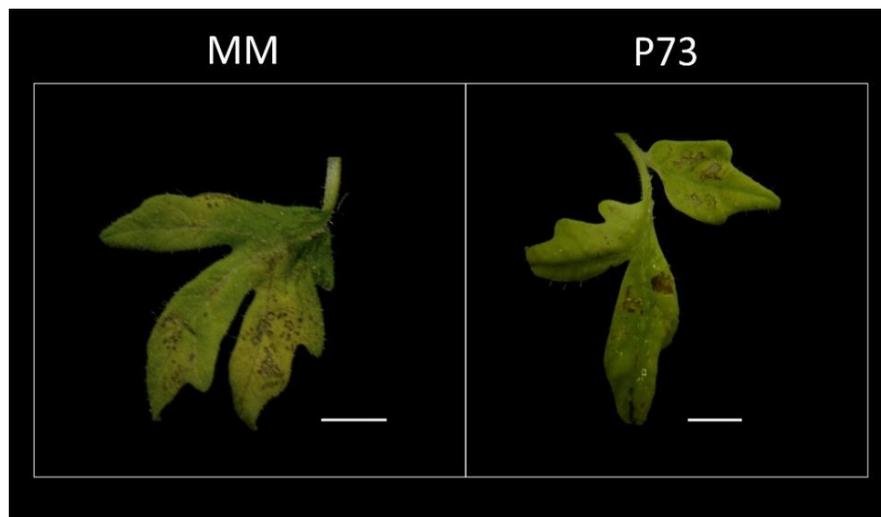
Por lo que respecta al desarrollo radicular adventicio, no se observaron diferencias claras entre las plantas transgénicas y las plantas WT (**Figura R4**). En las cinco líneas evaluadas, las plantas transgénicas mostraron una capacidad de enraizamiento semejante a la de las plantas WT. Sobre la base de estos resultados, el silenciamiento de los genes *FIN* y *CLV3* parece no tener efectos evidentes sobre el desarrollo del sistema radicular adventicio.



**Figura R4.** Desarrollo de raíces adventicias en plantas WT y plantas transgénicas.

Escala de barras: 1 cm.

Respecto al desarrollo de la parte aérea, no se observaron diferencias de crecimiento asociadas al silenciamiento de cualquiera de los dos genes. Sin embargo, se pudo observar la aparición de manchas cloróticas/necróticas en las hojas de las plantas Ri-*FIN*, tanto de p73 como de Moneymaker (**Figura R5**). Estas manchas también se observaron en las plantas emplazadas en invernadero, fenotipo que se describirá con más detalle en el apartado 4.4.1.b.



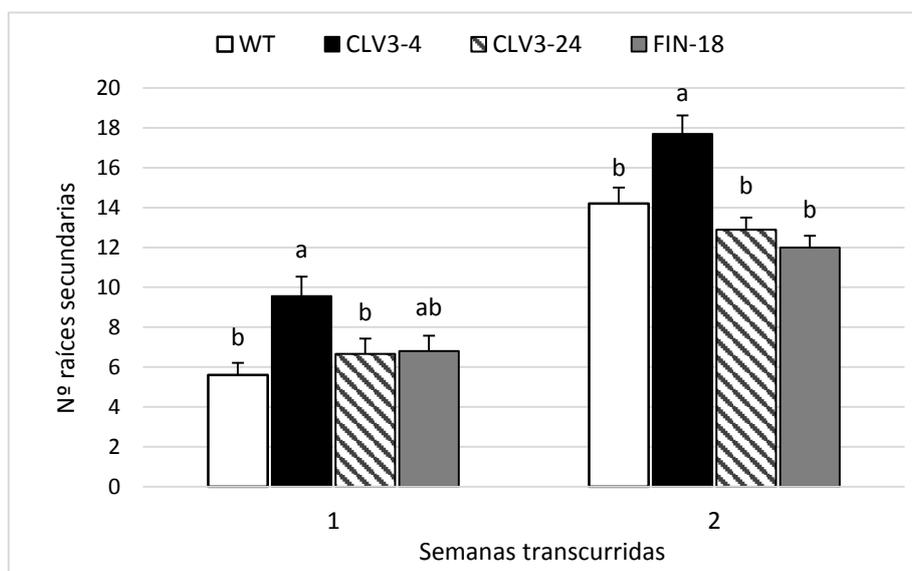
**Figura R5.** Manchas necróticas/cloróticas en hojas de plantas de Moneymaker (izq.) y p73 (dcha.) con el gen *FIN* silenciado.

Escala de barras: 0,5 cm.

#### 4.3.4 Caracterización del fenotipo de las plántulas: crecimiento de la parte aérea y desarrollo radicular embrionario

Para caracterizar el fenotipo de las plántulas se sembraron semillas de las cinco líneas y de dos lotes WT (p73 y Moneymaker) sobre un medio de cultivo básico (i.e. sin suplemento de hormonas). Se evaluó tanto el desarrollo de la raíz embrionaria como el crecimiento de la parte aérea durante 4 semanas de cultivo.

En relación con el desarrollo radicular embrionario, en las líneas transgénicas de Moneymaker no se observaron diferencias en la longitud de la raíz principal. Sin embargo, se vio que la línea *CLV3-4* de Moneymaker desarrollaba más raíces secundarias que el resto de las líneas transgénicas y que el WT. En efecto, transcurrida la primera semana desde el inicio del ensayo, el número de raíces secundarias de esta línea fue significativamente mayor que el de las plantas WT de Moneymaker y la línea *CLV3-24* de Moneymaker (**Figura R6**). Estas diferencias se mantuvieron a lo largo de la segunda semana de cultivo. De hecho, a lo largo de la segunda semana de cultivo también se observaron diferencias significativas respecto a la línea *FIN-18* de Moneymaker (**Figura R6**).

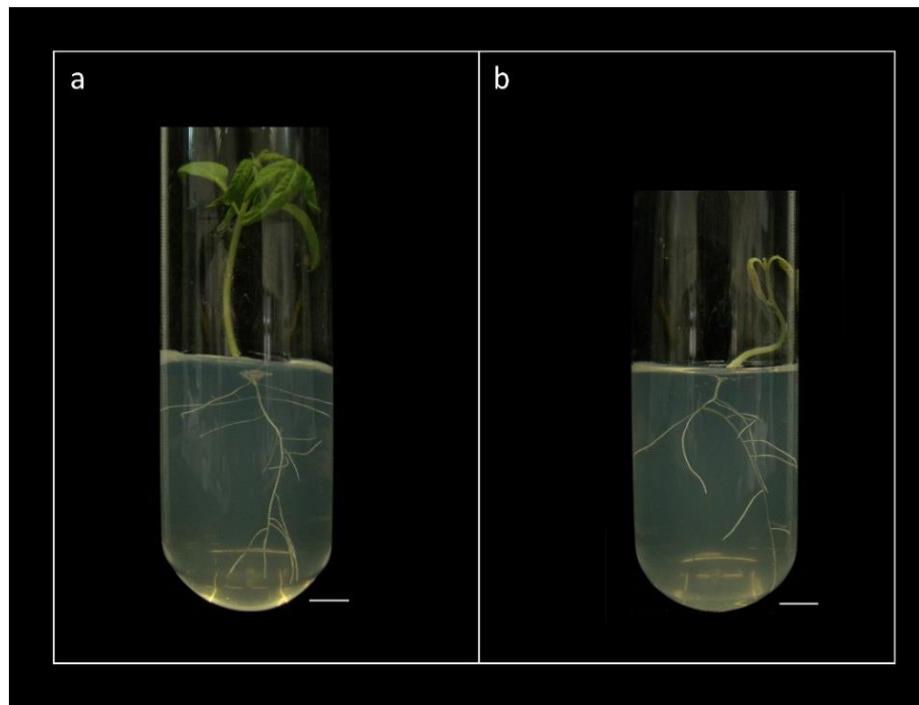


**Figura R6.** Número de raíces secundarias en plántulas de las líneas transgénicas Ri-*CLV3-4*, Ri-*CLV3-24*, Ri-*FIN-18* y en el WT de Moneymaker tras la primera y segunda semana de cultivo.

Los valores se expresan como la media  $\pm$  error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ; test de Fisher).

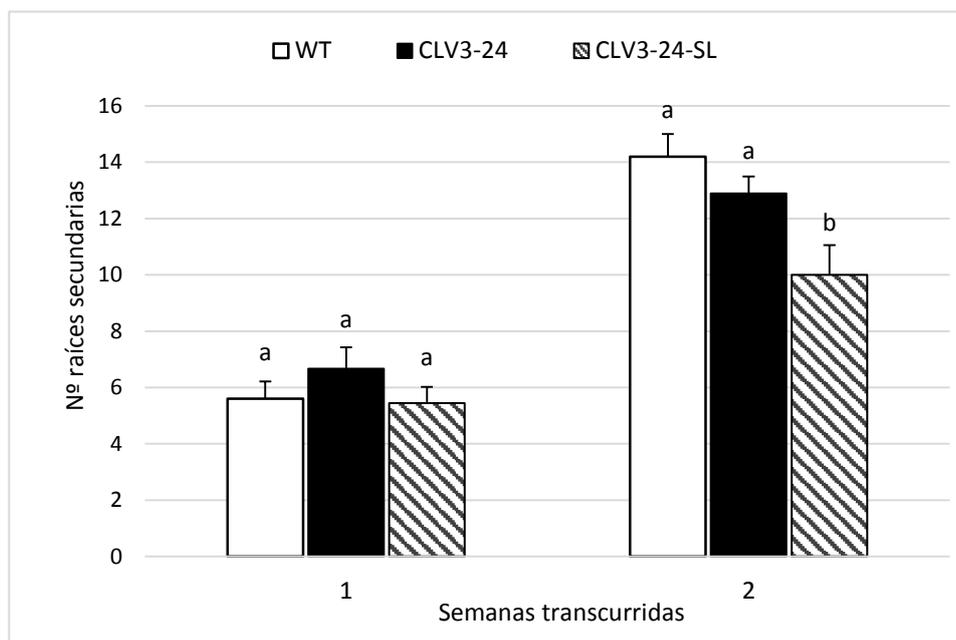
Conviene indicar que en estas líneas TG2 no se pudo identificar las líneas transgénicas y las WT (por ejemplo,  $\frac{1}{4}$  de la progenie Ri-*CLV3*-4 no contiene T-DNA, es decir, no tiene silenciado el gen *CLV3*). Con todo, el propósito de este ensayo era identificar diferencias claras entre líneas, y en este sentido, se vio que la mayor parte de las plantas de la progenie TG2 de la línea Ri-*CLV3*-4 desarrollaba mayor número de raíces secundarias. Para confirmar este resultado, se realizará un nuevo experimento con progenies TG3 que hayan fijado el T-DNA (i.e. líneas homocigóticas) para ver si, realmente, el silenciamiento de *CLV3* en esta línea promueve el desarrollo de un mayor número de raíces secundarias a lo largo de las primeras semanas de cultivo.

Respecto al desarrollo de la parte aérea, no se detectaron diferencias claras que pudieran estar asociadas al silenciamiento del gen entre la línea Ri-*CLV3*-4 y el resto de las líneas (i.e. Ri-*CLV3*-24, Ri-*FIN*-18 y línea WT de Moneymaker). No obstante, se vio que algunas de las plantas de la línea Ri-*CLV3*-24 exhibían síntomas claros de marchitamiento y flacidez a lo largo de la segunda semana de cultivo (**Figura R7**). Estas plantas no eran capaces de prosperar y terminaban muriendo como consecuencia del colapso del ápice caulinar.



**Figura R7.** Fenotipo de una planta no mutante (a) y de una planta con una mutación tipo *seedling lethal* (b) tras dos semanas de cultivo. Escala de barras: 1 cm.

La hipótesis es que estas plantas exhibían una mutación tipo *seedling lethal* que podría estar ocasionada por la inserción en homocigosis de uno de los dos T-DNAs que porta la línea Ri-*CLV3-24*. Puesto que las plantas mutantes se podían diferenciar claramente de las que no exhibían el fenotipo mutante, se quiso evaluar el número de raíces secundarias durante las dos primeras semanas de cultivo. Como se puede ver en la **figura R8**, a lo largo de la primera semana de cultivo, el número de raíces secundarias era similar en las plantas WT, y en las plantas no mutantes y mutantes de la línea Ri-*CLV3-24*. Sin embargo, a partir de la segunda semana de cultivo, es decir, cuando empezó a manifestarse el fenotipo, se detectaron diferencias significativas en el número de raíces de las plantas mutantes respecto a las no mutante de la misma línea y las WT (entre las que no existían diferencias significativas) (**Figura R8**). Estos resultados indican, como es lógico, que el número de raíces laterales disminuye significativamente a partir del momento en el que comienza a manifestarse el fenotipo mutante, es decir, a partir de la segunda semana de cultivo. En relación con este mutante, se realizarán análisis más exhaustivos en progenies TG3 de simple copia para tratar de confirmar si una de las dos copias es realmente la responsable del fenotipo *seedling lethal*.



**Figura R8.** Número de raíces secundarias tras la primera y segunda semana de cultivo en plantas WT y plantas de la línea Ri-*CLV3-24* de Moneymaker (MM) de fenotipo WT (*CLV3-24*) y mutante (*CLV3-24-SL*).

Los valores se expresan como la media  $\pm$  error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ; test de Fisher).

Con respecto a las líneas transgénicas de p73, no se vieron diferencias claras respecto a la línea WT, ni en caracteres relacionados con el desarrollo radicular (i.e. longitud de raíz principal o número de raíces secundarias), ni en caracteres asociados al desarrollo de la parte aérea (i.e. altura de la planta o número de hojas).

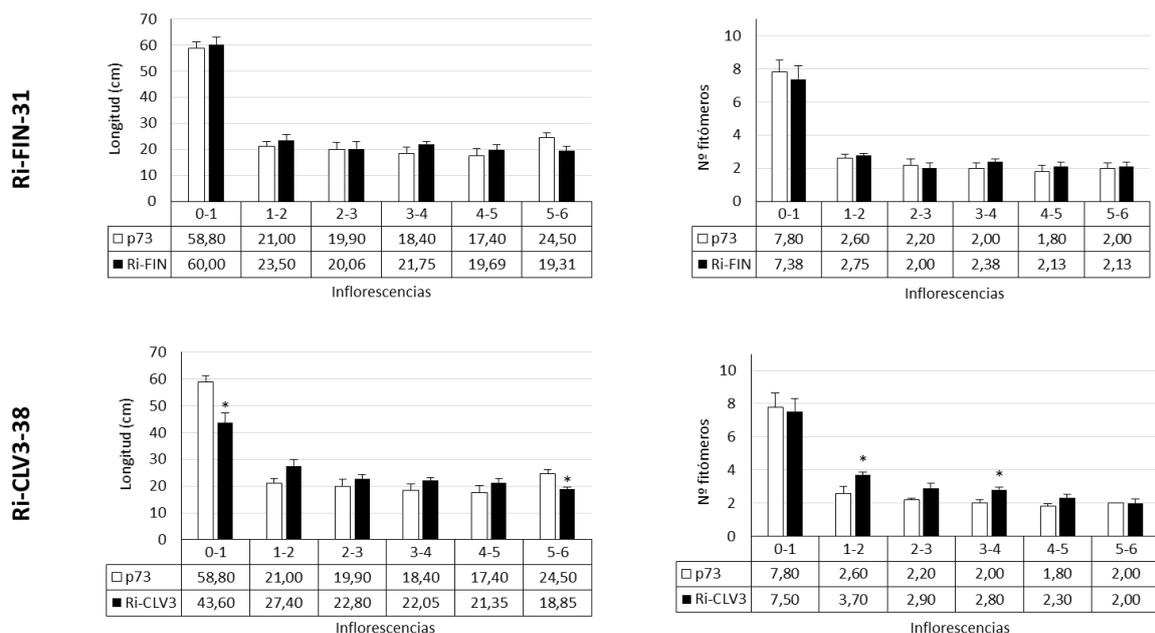
#### **4.4. Caracterización fenotípica de las líneas de sobreexpresión en invernadero**

Para evaluar el fenotipo de las plantas en invernadero se cultivaron 12 plantas TG2 de cada una de las líneas. Se evaluaron caracteres relacionados tanto con el desarrollo vegetativo como reproductivo. Por lo que respecta al desarrollo vegetativo, se determinó la distancia y el número de fitómeros desde la base hasta la primera inflorescencia y entre las primeras 6 inflorescencias. Respecto al desarrollo reproductivo, teniendo en cuenta el efecto del silenciamiento de estos genes sobre el tamaño del meristemo floral, desde el momento en el que se desarrollaron las primeras flores se evaluó el número de órganos por verticilo floral. Además, se evaluó el número de flores y frutos cuajados en las primeras 7 inflorescencias, el calibre medio de los frutos y la producción de las 6 primeras inflorescencias.

##### **4.4.1. Caracterización del desarrollo vegetativo**

###### 4.4.1.a. Distancia y número de fitómeros desde la base hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias

En p73 no se observaron grandes diferencias en relación con la distancia y el número de fitómeros desde la base hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias en la línea con el gen *FIN* silenciado (**Figura R9**). Respecto a la línea con el gen *CLV3* silenciado, se vio que la distancia desde la base hasta la primera inflorescencia era significativamente menor en las plantas silenciadas, aunque no se detectaron diferencias significativas en el número de fitómeros (**Figura R9**). Es decir, hasta el desarrollo de la primera inflorescencia, la distancia entre fitómeros (i.e. distancia internodal) fue ligeramente menor en las plantas Ri-*CLV3*. Algo similar ocurrió entre la 5ª y 6ª inflorescencia. También se vio que el número de fitómeros entre algunas inflorescencias (i.e. 1ª y 2ª, o 3ª y 4ª) fue mayor en las plantas con *CLV3* silenciado.

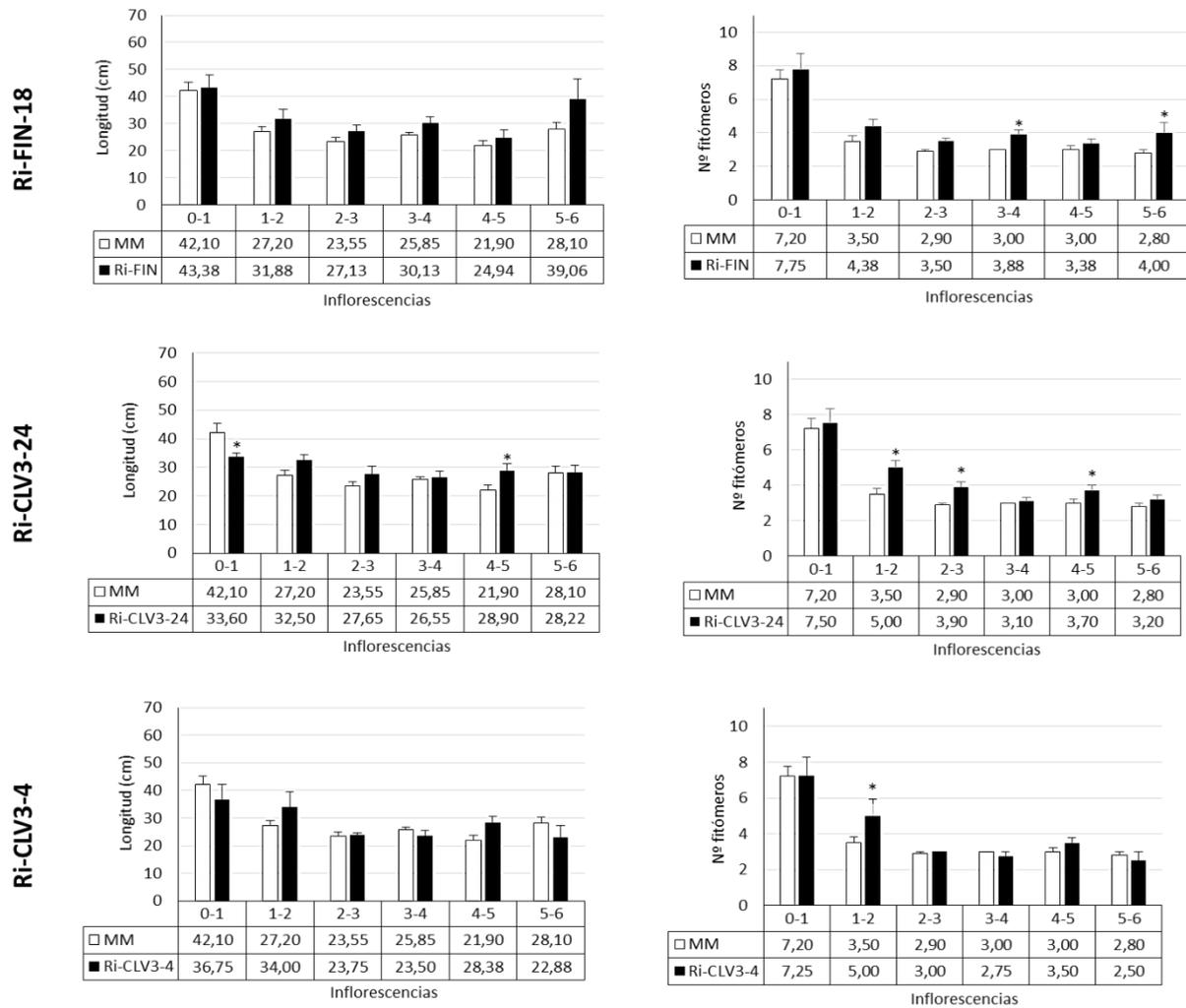


**Figura R9.** Distancia en centímetros (izq.) y número de fitómeros (dcha.) desde la base hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias en p73 y en las líneas Ri-*FIN*-31 y Ri-*CLV3*-38.

\* Indica diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ; test de Fisher).

En Moneymaker los resultados fueron similares. Por ejemplo, no se observaron diferencias en relación con la distancia desde la base hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias en la línea con el gen *FIN* silenciado; y en esta línea sólo se vio que el número de fitómeros entre algunas inflorescencias (i.e. 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup>, o 5<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup>) era significativamente mayor en las plantas Ri-*FIN* (**Figura R10**).

Respecto a las líneas con el gen *CLV3* silenciado, la distancia desde la base hasta la primera inflorescencia fue significativamente menor en las plantas silenciadas de la línea Ri-*CLV3*-24, aunque no se detectaron diferencias significativas en el número de fitómeros desde la base hasta la primera inflorescencia (**Figura R10**). En esta línea se vio que el número de fitómeros entre inflorescencias (i.e. 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> y 3<sup>a</sup>, o 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup>) era significativamente mayor en las plantas silenciadas que en las plantas WT; y la distancia entre la 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> inflorescencia era significativamente mayor.



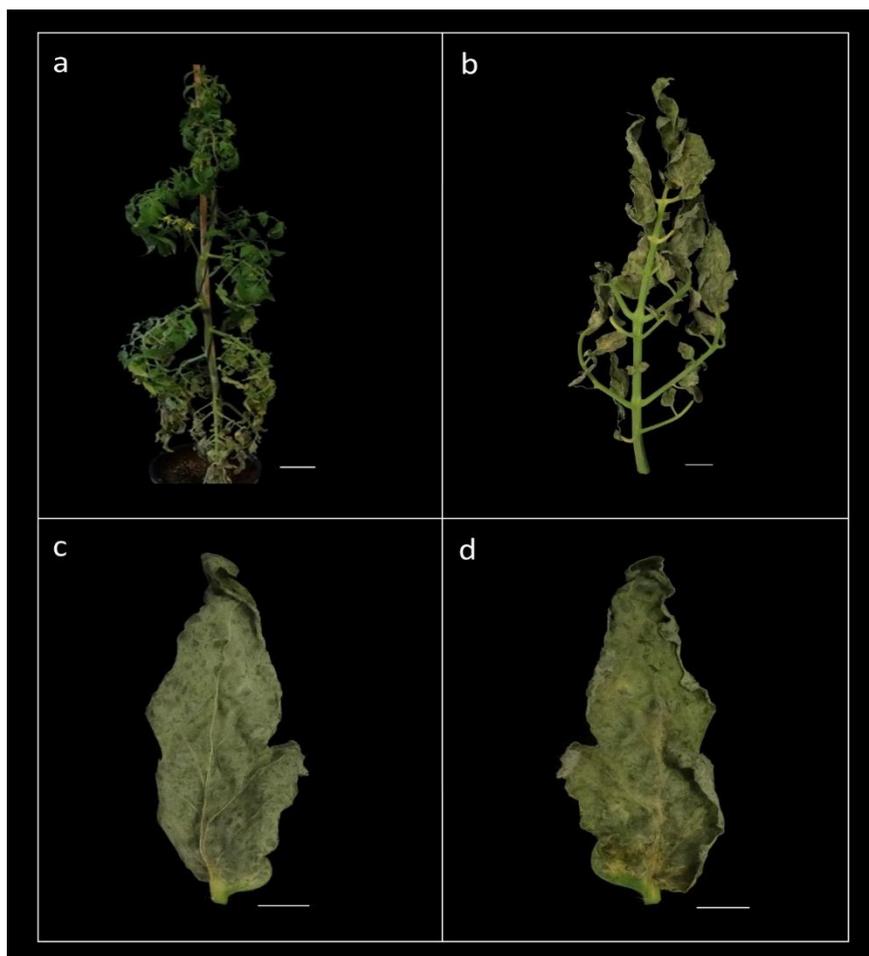
**Figura R10.** Distancia en centímetros (izq.) y número de fitómeros (dcha.) desde la base hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias en MM y las líneas Ri-FIN-18, Ri-CLV3-24 y Ri-CLV3-4.

\* Indica diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ; test de Fisher).

En definitiva, los resultados parecen indicar que el silenciamiento de *FIN* o *CLV3* en las dos variedades de tomate no tiene efectos claros sobre la arquitectura vegetativa de las plantas. En cualquier caso, parece que las plantas silenciadas (principalmente para *CLV3*) tenga una cierta tendencia a desarrollar más fitómeros que las plantas WT a partir del desarrollo de la primera inflorescencia, lo que podría estar relacionado con la interacción entre los genes *WUS-CLV3*.

#### 4.4.1.b. Efectos del silenciamiento de *FIN* sobre el desarrollo foliar

Se vio que las hojas desarrolladas de las plantas transgénicas que tenían silenciado el gen *FIN*, tanto en p73 como en Moneymaker, exhibían síntomas prematuros de senescencia. En estas hojas, que parecían estar afectadas por alguna enfermedad fúngica, aparecían numerosas manchas necróticas y se secaban rápidamente (**Figura R11**).



**Figura R11.** Efectos del silenciamiento de *FIN* sobre el desarrollo foliar en planta completa (a), rama con hojas desarrolladas (b), haz de la hoja (c) y envés de la hoja (d).

Escala de barras: a) 10 cm, b) 2 cm, c y d) 1 cm.

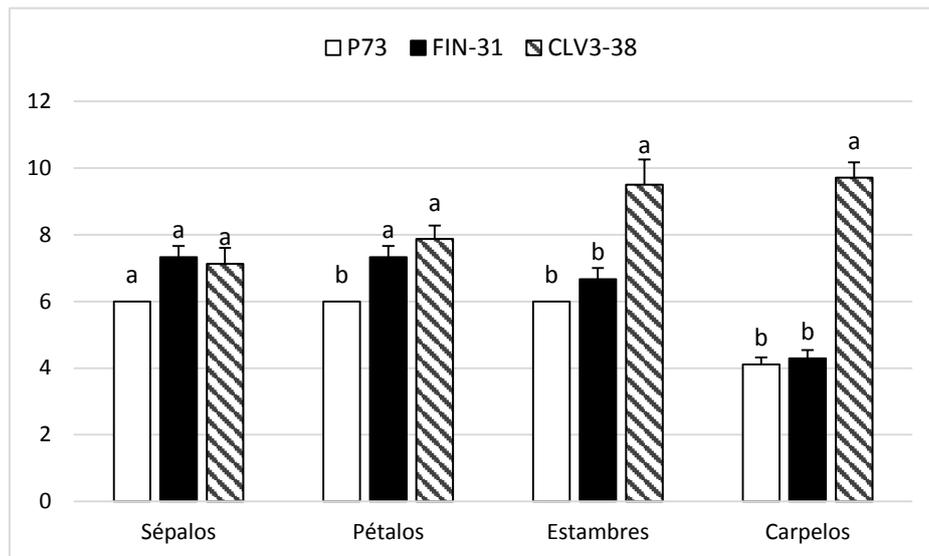
Se pudo comprobar que este fenotipo solo aparecía en las plantas con el gen *FIN* silenciado, ya que las plantas WT cultivadas junto a ellas, o las que tenían silenciado el gen *CLV3*, no exhibían estos síntomas. Conviene recordar que estos síntomas, aunque menos severos, también se habían observado en las plantas axénicas *in vitro*. Estos resultados indican que el silenciamiento de *FIN* tiene efectos pleiotrópicos sobre el desarrollo de las hojas, que afectan, en última instancia, a la productividad, tal y como se comenta en el apartado 4.4.2.

#### **4.4.2. Caracterización del desarrollo reproductivo**

##### **4.4.2.a. Caracterización del número de órganos en los verticilos florales**

Para caracterizar el desarrollo de las flores en las líneas de silenciamiento de ambas variedades se contabilizó el número de órganos florales por verticilo en flores en estadio de antesis. Las flores del

WT de p73 están compuestas por 6 sépalos, 6 pétalos, 6 estambres y en torno a 3-5 carpelos. Respecto al WT, no había diferencias significativas en el número de sépalos de las dos líneas de silenciamiento de p73 (i.e. *FIN-31* y *CLV3-38*). En la línea con el gen *FIN* silenciado, solo había diferencias significativas en el número de pétalos respecto al WT, pero no en el número de estambres y carpelos (**Figura R12**). En la línea con el gen *CLV3* silenciado, el número de pétalos, estambres y carpelos fue significativamente más elevado que en el WT (**Figuras R12 y R13**).



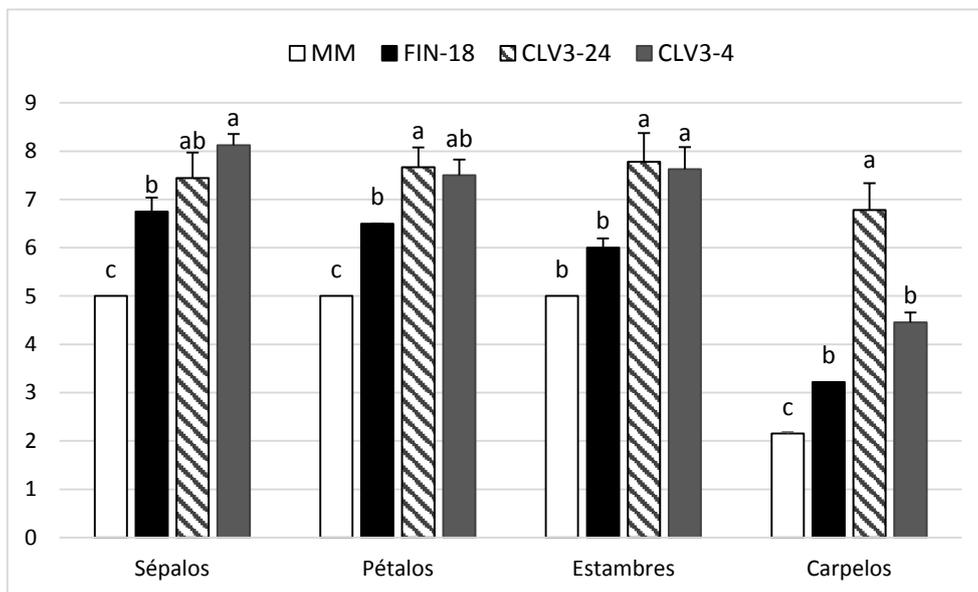
**Figura R12.** Número de órganos florales en el WT y en las líneas transgénicas Ri-*FIN-31* y Ri-*CLV3-38*.

Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ; test de Fisher).

En el caso de Moneymaker, las flores del WT están compuestas por 5 sépalos, 5 pétalos, 5 estambres y, mayoritariamente, 2 carpelos. Las líneas de silenciamiento de MM (*FIN-18*, *CLV3-4* y *CLV3-24*) tenían significativamente más sépalos, pétalos y carpelos que el WT (**Figura R13**). Tan solo el número de estambres de la línea con el gen *FIN* silenciado no difería significativamente respecto al WT, al contrario que en las líneas con el gen *CLV3* silenciado en las que sí que existían diferencias significativas en el número de órganos de este verticilo (**Figura R14**). Además, al igual que ocurría en las líneas de silenciamiento de p73, se pudo comprobar que el silenciamiento de *CLV3* tenía más impacto en el incremento del número de órganos por verticilo que el silenciamiento de *FIN* (**Figura R14**). También se pudo comprobar que el incremento en el número de órganos era más notable en la línea 24 que en la línea 4 (**Figura R14**), lo que podría deberse al hecho de que esta línea porta dos copias de T-DNA y el nivel de silenciamiento del gen *CLV3* podría ser mayor.



**Figura R13.** Flor de una planta WT (a) y de una planta de la línea Ri-*CLV3*-24 con mayor número de órganos florales (b).  
Escala de barras: 0.5 cm



**Figura R14.** Número de órganos florales en el WT y en las líneas Ri-*FIN*-18, Ri-*CLV3*-24 y Ri-*CLV3*-4.  
Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ; test de Fisher).

#### 4.4.2.b. Caracterización de diferentes caracteres relacionados con la producción

La caracterización de diferentes caracteres relacionados con la producción indicó que las líneas con el gen *FIN* silenciado tanto de p73 como de Moneymaker producían menos porque desarrollaban frutos de menos calibre, mientras que las líneas con el gen *CLV3* silenciado de las dos variedades de tomate producían más debido a que sus frutos eran de mayor calibre (**Tablas R3 y R4**).

En lo que respecta a las líneas de silenciamiento de p73, en las plantas que tenían el gen *FIN* silenciado no había diferencias significativas respecto al WT en el número de flores y frutos por inflorescencia, tasa de cuajado, peso del fruto o número de lóculos. A pesar de la ausencia de diferencias significativas, el peso medio de los frutos de las líneas Ri-*FIN* era considerablemente menor, motivo por el cual produjeron significativamente menos que el WT (**Tabla R3**).

Por el contrario, las plantas que con el gen *CLV3* silenciado desarrollaron el mismo número de flores que el WT, pero tanto el número de frutos por inflorescencia como la tasa de cuajado eran significativamente menores (**Tabla R3**). Sin embargo, respecto a los del WT, los frutos de las plantas silenciadas eran de un calibre significativamente mayor debido a que tenían más lóculos (**Figura R15**). Como consecuencia, las plantas Ri-*CLV3* de p73 produjeron significativamente más que las plantas WT (**Tabla R3**).

**Tabla R3.** Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo en el WT y en las líneas Ri-*FIN*-31 y Ri-*CLV3*-38 de p73.

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	Ri- <i>FIN</i> -31	Ri- <i>CLV3</i> -38
Flores por inflorescencia	8,03 $\pm$ 0,82 (a)	7,63 $\pm$ 0,26 (a)	7,25 $\pm$ 0,38 (a)
Frutos por inflorescencia	5,07 $\pm$ 0,31 (ab)	5,85 $\pm$ 0,34 (a)	4,32 $\pm$ 0,31 (b)
Tasa de cuajado (%)	69,61 $\pm$ 5,29 (a)	76,70 $\pm$ 3,19 (a)	58,91 $\pm$ 2,26 (b)
Peso del fruto (g)	98,02 $\pm$ 3,34 (b)	83,99 $\pm$ 2,13 (b)	168,72 $\pm$ 13,24 (a)
Lóculos por fruto	4,11 $\pm$ 0,22 (b)	4,29 $\pm$ 0,25 (b)	9,71 $\pm$ 0,44 (a)
Producción por planta (g)	1519,82 $\pm$ 127,67 (b)	1058,70 $\pm$ 117,05 (c)	2154,22 $\pm$ 77,16 (a)

De forma parecida a lo que ocurría en p73, las plantas Ri-*FIN* de Moneymaker producían significativamente menos que las plantas WT (**Tabla R4**). La diferencia es que éstas desarrollaban significativamente menos frutos de menor calibre por inflorescencia y exhibían menor tasa de cuajado. Además, a diferencia de lo que ocurría en las plantas Ri-*FIN* de p73, en las que no había diferencias significativas en el número de lóculos de los frutos, las Ri-*FIN* de Moneymaker desarrollaban frutos con un número significativamente mayor de lóculos respecto al WT (**Tabla R4**).

**Tabla R4.** Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo en el WT y en las líneas Ri-*FIN*-18, Ri-*CLV3*-24 y Ri-*CLV3*-4.

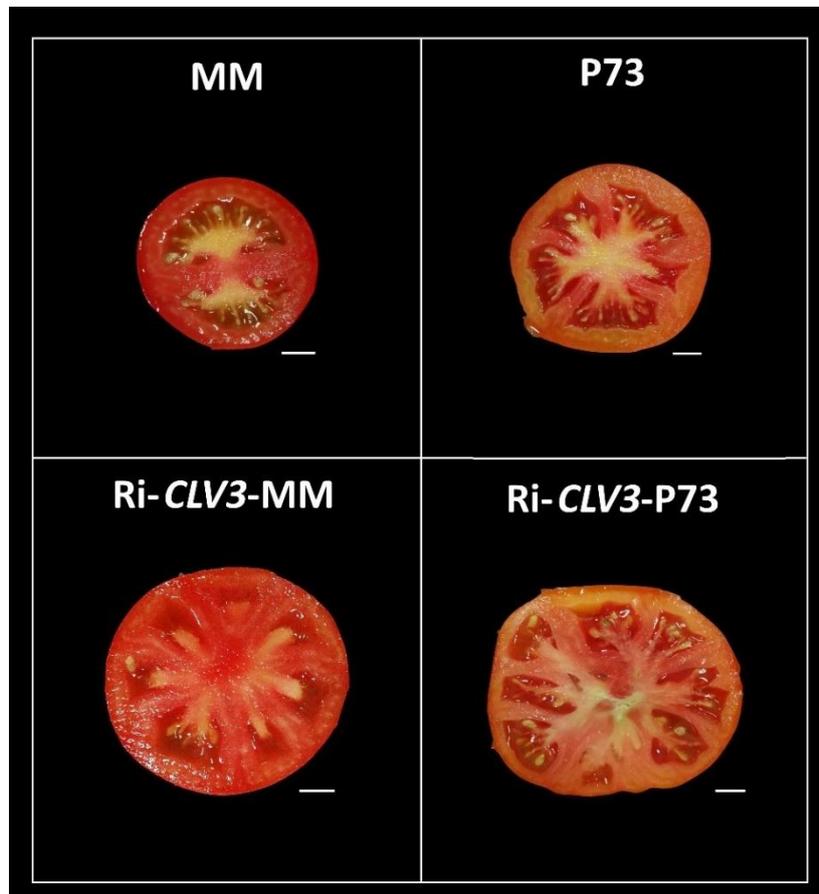
Los valores se expresan como la media  $\pm$  error estándar. Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ; test de Fisher).

Parámetros	WT	Ri- <i>FIN</i>	Ri- <i>CLV3</i> -24	Ri- <i>CLV3</i> -4
Flores por inflorescencia	12,62 $\pm$ 0,73 (b)	9,38 $\pm$ 0,87 (b)	25,02 $\pm$ 3,34 (a)	19,21 $\pm$ 3,13 (ab)
Frutos por inflorescencia	10,80 $\pm$ 3,05 (a)	5,41 $\pm$ 0,50 (b)	10,34 $\pm$ 1,03 (a)	12,40 $\pm$ 2,78 (a)
Tasa de cuajado (%)	87,72 $\pm$ 0,55 (a)	54,33 $\pm$ 4,36 (b)	45,03 $\pm$ 5,95 (b)	60,89 $\pm$ 10,94 (b)
Peso del fruto (g)	57,73 $\pm$ 2,79 (b)	39,86 $\pm$ 3,50 (c)	75,81 $\pm$ 1,27 (a)	75,26 $\pm$ 2,06 (a)
Lóculos por fruto	2,15 $\pm$ 0,03 (c)	3,22 $\pm$ 0,19 (b)	6,78 $\pm$ 0,55 (a)	4,45 $\pm$ 0,20 (b)
Producción por planta (g)	1197,15 $\pm$ 167,19 (b)	522,13 $\pm$ 82,32 (c)	1592,80 $\pm$ 200,18 (ab)	2034,20 $\pm$ 477,41 (a)

En nuestra opinión la menor producción por planta de las líneas Ri-*FIN*, tanto de p73 como de Moneymaker, se debe al efecto pleiotrópico que ocasiona el silenciamiento de este gen en las hojas de las plantas transgénicas (ver apartado 4.4.1.b. Efectos del silenciamiento de *FIN* sobre el desarrollo foliar). En este sentido, los daños que sufren las hojas (principales órganos fuente) consecuencia del silenciamiento de *FIN* limitan la producción y el flujo de fotoasimilados a los frutos (principales sumideros de la planta).

Las plantas Moneymaker con el gen *CLV3* silenciado tenían un comportamiento similar a las Ri-*CLV3* de p73. En este sentido, la tasa de cuajado de las plantas Ri-*CLV3* de Moneymaker era menor que la del WT, sin embargo, la producción era bastante (i.e. Ri-*CLV3*-24) o significativamente (Ri-*CLV3*-4) mayor. Al igual que en las plantas Ri-*CLV3* de p73, la mayor producción de las plantas Ri-*CLV3* de Moneymaker se debía a un calibre significativamente mayor de sus frutos, y éste a su vez era consecuencia de un mayor número de lóculos (**Tabla R4**) (**Figura R15**). De las dos líneas Ri-*CLV3*, la línea Ri-*CLV3*-24 merece un comentario especial por dos razones: i) el número medio de flores por inflorescencia era significativamente mayor al del WT (más del doble), y ii) el número medio de

lóculos de cada fruto era más de tres veces mayor que el del WT. Como se comentaba en el apartado anterior (i.e. apartado 4.4.2.a. Caracterización del número de órganos en los verticilos florales), el mayor número de flores por inflorescencia o lóculos por fruto podría deberse a un mayor silenciamiento del gen *CLV3* consecuencia de la integración de dos copias de T-DNA.

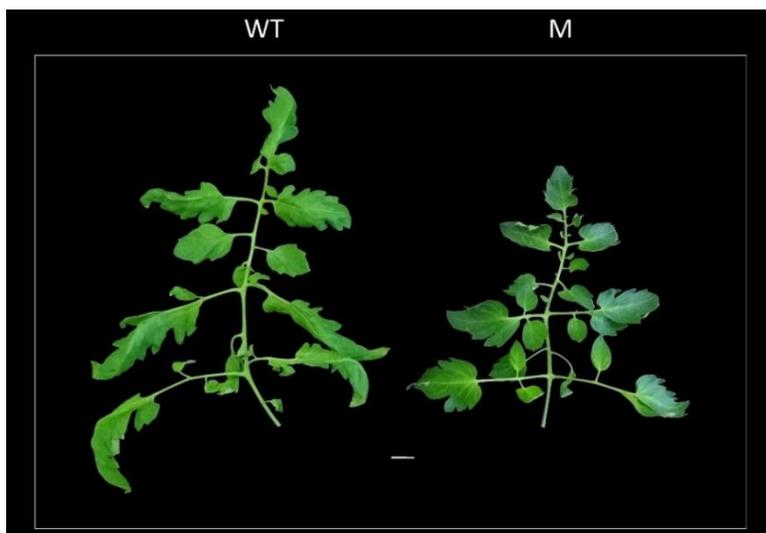


**Figura R15.** Corte de frutos WT de MM (arriba izq.) y de p73 (arriba dcha.) y de líneas transgénicas Ri-*CLV3* de MM (abajo izq.) y de p73 (abajo dcha.).

Escala de barras: 1 cm.

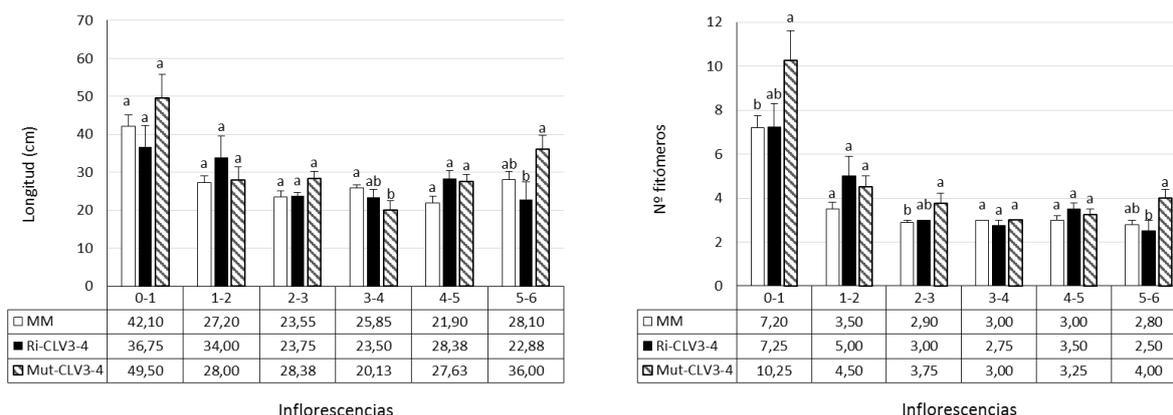
#### 4.4.2.c. Identificación de un mutante del desarrollo en la progenie TG2 Ri-*CLV3*-4 de MoneyMaker

Durante la caracterización fenotípica en invernadero de la línea segregante Ri-*CLV3*-4 de MoneyMaker, se identificó un mutante de naturaleza recesiva afectado en caracteres del desarrollo que despertó interés. Se vio que las plantas de fenotipo mutante desarrollaban hojas de color verde más intenso y de menor tamaño que las de plantas WT (**Figura R16**).



**Figura R16.** Hojas desarrolladas de una planta WT (izq.) y de una planta mutante (dcha.) de la línea Ri-CLV3-4. Escala de barras: 2 cm.

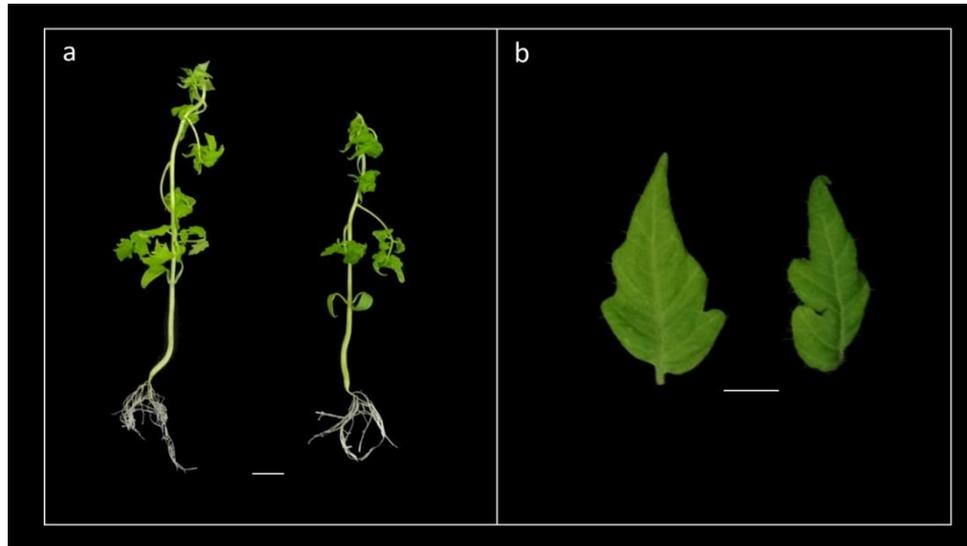
Respecto a la distancia desde la base a la primera inflorescencia y entre inflorescencias, no se detectaron diferencias importantes entre el mutante y las plantas WT, o entre el mutante y las plantas Ri-CLV3 no mutantes (**Figura R17**). En cuanto al número de fitómeros, los resultados parecen indicar que se trata de un mutante de floración tardía, toda vez que, respecto al WT, el número de fitómeros desde la base a la primera inflorescencia fue significativamente mayor. Entre inflorescencias, sin embargo, el número de fitómeros del mutante es similar al de las plantas WT (**Figura R17**).



**Figura R17.** Distancia en centímetros (izq.) y número de fitómeros (dcha.) desde la base hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias en Moneymaker (MM), en plantas Ri-CLV3-4 sin mutación (Ri-CLV3-4) y con mutación (Mut-CLV3-4).

Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0,05$ ; test de Fisher).

Cuando se vio el fenotipo en el invernadero, se revisaron las plantas que se habían cultivado *in vitro* y se identificaron algunas que podrían ser las de fenotipo mutante. Estas plantas se caracterizaban por tener un hipocótilo de menor longitud que el de las plantas WT y hojas más pequeñas. Además, la raíz de estas plantas era menos ramificada (**Figura R18**).



**Figura R18.** Diferencias en el fenotipo de plantas WT (izq.) y plantas mutantes (dcha.) *in vitro* en plántula (a) y en hoja en detalle (b).  
Escala de barras: a) 2 cm, b) 0.5 cm.

Con todo, las diferencias más interesantes se detectaron en caracteres del desarrollo reproductivo. En efecto, las plantas de fenotipo mutante desarrollaban inflorescencias muy ramificadas con más de 40 flores (**Tabla R5**). En estas enormes inflorescencias cuajaba un elevado número de frutos; sin embargo, en la mayoría de los casos, se trataba de frutos de pequeño calibre que no contenían semilla, lo que explica la escasa producción obtenida a partir de estas plantas (**Tabla R5**).

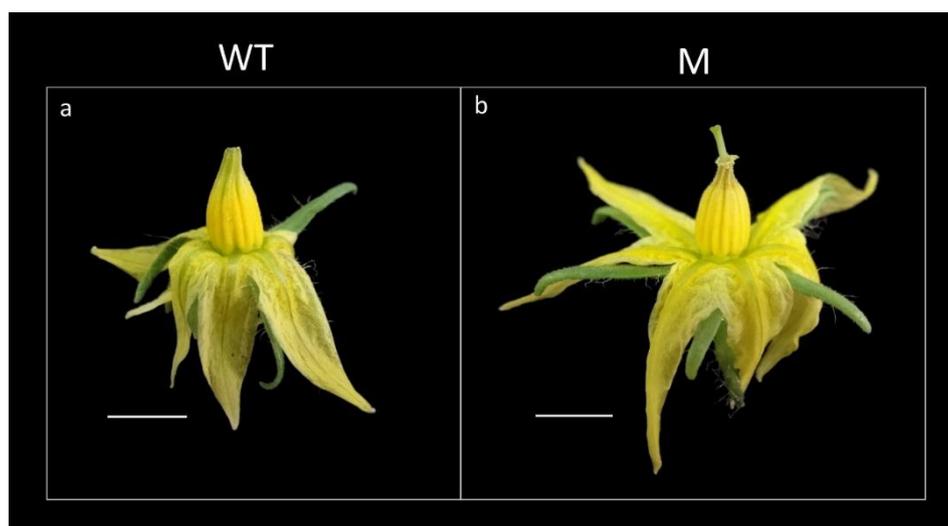
**Tabla R5.** Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo en el WT y en plantas no mutantes (Ri-CLV3-4) y mutantes (Mut-CLV3-4) de la línea Ri-CLV3-4.

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	Ri-CLV3-4	Mut-CLV3-4
Flores por inflorescencia	12,62 $\pm$ 0,73 (b)	19,21 $\pm$ 3,13 (b)	42,53 $\pm$ 9,60 (a)
Frutos por inflorescencia	10,80 $\pm$ 3,05 (b)	12,40 $\pm$ 2,78 (b)	19,79 $\pm$ 3,53 (a)
Tasa de cuajado (%)	87,72 $\pm$ 0,55 (a)	60,89 $\pm$ 10,94 (b)	55,48 $\pm$ 5,45 (b)
Peso del fruto (g)	57,73 $\pm$ 2,79 (b)	75,26 $\pm$ 2,06 (a)	18,65 $\pm$ 2,23 (c)
Lóculos por fruto	2,15 $\pm$ 0,03 (b)	4,45 $\pm$ 0,20 (a)	6,04 $\pm$ 1,16 (a)
Producción por planta (g)	1197,15 $\pm$ 167,19 (b)	2034,20 $\pm$ 477,41 (a)	82,09 (c)

Con el objetivo de dilucidar la ausencia de semillas en los frutos, se analizó la viabilidad del polen mediante tinción con tetrazolio, pero no se vieron diferencias entre el polen de las plantas mutantes y el de las plantas WT.

Una de las causas del elevado número de frutos sin semilla en las plantas mutantes podría ser la longistilia que exhiben sus flores. Como se puede ver en la **figura R19**, el estilo de las flores mutantes sobresalía del cono estaminal, lo que muy probable esté mermando el proceso de autofecundación. Para obtener más información, en el laboratorio se realizarán cruces recíprocos entre plantas WT y mutante, así como autofecundaciones manuales, a lo largo de la próxima cosecha.



**Figura R19.** Flores en estadio de antesis de una planta WT (izq.) y de una planta mutante (dcha.) de la línea Ri-CLV3-4.

Escala de barras: 0.5 cm.

Los resultados del fenotipado anticipan la posibilidad de que se trate de un mutante de tipo insercional ocasionado por la integración del T-DNA en homocigosis. En efecto, la evaluación fenotípica de estas plantas indica que todas las plantas de fenotipo mutante exhiben uno de los caracteres más relevantes promovidos por el silenciamiento del gen *CLV3*. Por ejemplo, el número de lóculos de los frutos de estas plantas es significativamente mayor al de los frutos WT (**Tabla R5**).

Se mantiene, en cualquier caso, la duda de si la enorme ramificación de las inflorescencias es un efecto promovido por el silenciamiento del gen *CLV3* o una suma de efectos promovidos por la mutación y el silenciamiento de *CLV3*. En este sentido, si el mutante realmente es insercional, la única forma de clarificar esta duda será mediante la obtención de plantas transgénicas que anulen (i.e. mediante la tecnología CRISPR-Cas) o silencien (mediante la tecnología de interferencia por RNA) la actividad del gen etiquetado; ya que la mutación siempre irá asociada al T-DNA que promueve el silenciamiento de *CLV3*.

Para obtener más información acerca de la mutación, las plantas de fenotipo mutante se introdujeron *in vitro* y se evaluaron para la resistencia a la kanamicina. Se vio que todas las plantas de fenotipo mutante eran resistentes a la kanamicina. Estos resultados apuntan hacia la posibilidad de que el mutante sea insercional, aunque son muy preliminares y conviene ser cautos ya que el número de plantas mutantes evaluadas ha sido escaso. Por ello, en la siguiente cosecha se cultivará un mayor número de plantas de la línea segregante, para identificar nuevas plantas mutantes y evaluar su carácter transgénico. Además, se analizará la segregación de las progenies derivadas de las plantas TG2 con fenotipo *CLV3* (i.e. silenciamiento de *CLV3*). Si el mutante es de tipo insercional y esta ocasionado por la integración en homocigosis del T-DNA, las plantas TG2 con fenotipo *CLV3* deben ser hemigóticas para el T-DNA y, por tanto, sus progenies deberían segregarse para la kanamicina y la mutación (i.e. es decir, deberían comportarse a nivel genético como una TG2). Será, por consiguiente, otro dato que confirme la hipótesis (i.e. se trata de una mutación insercional).



## 5. DISCUSIÓN

---



## 5. DISCUSIÓN

---

Uno de los factores determinantes del tamaño final del fruto de tomate es la tasa de división celular en el meristemo floral, en el ovario y al inicio del desarrollo del fruto, carácter que está regulado por *FRUIT WEIGHT 2.2 (FW2.2)*, un gen que codifica un regulador negativo del ciclo celular (Liu *et al.*, 2003) y *FRUIT WEIGHT 3.2 (FW3.2)*, que codifica un citocromo P450 y es ortólogo del gen *KLUH* de *Arabidopsis* (Chakrabarti *et al.*, 2013). Sin embargo, es el número de carpelos en la flor y, por ende, el número final de lóculos, el responsable de aumentos de tamaño de hasta el 50% (Tanksley, 2004). A su vez, el número de órganos florales viene determinado por el tamaño del meristemo floral, cuya regulación implica un mecanismo de retroalimentación negativo entre el factor de transcripción *WUSCHEL (WUS)*, necesario para mantener la actividad indiferenciada de las células meristemáticas, y los genes *CLAVATA (CLV1, CLV2 y CLV3)*, promotores de la diferenciación celular. *WUS* se expresa en el centro organizador de la zona central del SAM, donde regula la transcripción de numerosos genes implicados en procesos relacionados con actividad meristemática y división celular. Por otro lado, *WUS* induce la expresión del péptido señal *CLV3*, el cual es reconocido por los receptores de membrana *CLV1* y *CLV2*, activando una cascada de señalización que inhibe la propia expresión de *WUS*. Es decir, el tamaño del meristemo se mantiene constante gracias a la acción combinada de *WUS* y *CLV3*. De este modo, la ruta *CLV/WUS* establece un equilibrio dinámico entre células que se mantienen indiferenciadas y otras que adquieren identidad de primordio de los distintos órganos de la planta, constituyendo una vía de regulación meristemática que se encuentra muy conservada en plantas. Así, tanto en *Arabidopsis* como en tomate, mutaciones en los genes *CLV* aumentan el tamaño del meristemo floral mediante la expansión los dominios de expresión de *WUS*, dando lugar a flores con un mayor número de órganos (Xu *et al.*, 2015).

La importancia de la arabinosilación para la actividad de *CLV3* en *Arabidopsis* no está muy clara (MacAlister *et al.*, 2016); sin embargo, se ha demostrado que es esencial en tomate. De hecho, la mutación del gen *FASCIATED INFLORESCENCE (FIN)* que codifica una hidroxiprolina O-arabinosiltransferasa (HPAT) origina un aumento del tamaño del meristemo y, por ende, el desarrollo de un mayor número de órganos florales y frutos multiloculados (Xu *et al.*, 2015). El fenotipo *fin* puede ser restaurado mediante la adición exógena del péptido *SICLV3* arabinosilado, lo que confirma que la arabinosilación de *SICLV3* es imprescindible para el mantenimiento del tamaño del SAM en tomate.

En tomate, estudios recientes demuestran que dos mutaciones en la ruta meristemática *CLV/WUS*, a saber, *locule number (lc)* y *fasciated (fas)*, son las principales responsables del aumento del tamaño

del fruto que tuvo lugar durante el proceso de domesticación y mejora de esta especie. La mutación *lc* afecta a una región reguladora del gen ortólogo a *WUS*, mientras que *fas* se localiza en el promotor del ortólogo a *CLV3*. Ambas mutaciones actúan de forma sinérgica aumentando el tamaño del meristemo floral, lo que da lugar a un incremento en el número de carpelos de la flor y con ellos, al desarrollo de frutos pluriloculares de gran tamaño.

En este trabajo de investigación se ha evaluado el impacto del silenciamiento de los genes *CLV3* y *FIN* en dos variedades diferentes de tomate, a saber, Moneymaker, que no porta la mutación *lc* y produce frutos biloculares, y p73, que porta la mutación *lc* y produce frutos multiloculares. En nuestro laboratorio ya se habían obtenido las plantas transgénicas (i.e. TG1) con los genes *CLV3* y *FIN*, se habían evaluado los frutos de estas plantas en invernadero y se habían obtenido sus progenies TG2. Para abordar los objetivos de este trabajo, se identificó, mediante análisis de segregación en medio suplementado con kanamicina, las progenies transgénicas de simple copia, y se seleccionaron las más interesantes sobre la base de los resultados del análisis de segregación (i.e. líneas de simple copia) y de la caracterización fenotípica que se había realizado en el invernadero (i.e. plantas que produjeran frutos con elevado número de lóculos). Así, se seleccionaron dos líneas de silenciamiento de p73, una con el gen *FIN* y otra con el gen *CLV3*, y otras dos de Moneymaker, una con el gen *FIN* y otra con el gen *CLV3*; todas ellas de simple copia (i.e. segregaban en medio con kanamicina para 1 inserto funcional). Pero, además, por el fenotipo de sus frutos en invernadero (i.e. frutos con elevado número de lóculos), se seleccionó una línea de silenciamiento de *CLV3* en Moneymaker que portaba dos copias de T-DNA.

Como se comentaba en un párrafo anterior, mutaciones en los genes *CLV* (i.e. *CLV3*) promueven la expansión los dominios de expresión de *WUS*. Por otro lado, según Azzi *et al.*, (2015), *SIWUS* (el gen *WUS* de tomate) está implicado en la regulación del desarrollo del fruto mediante el control de la división celular. Además, se sabe que *WUS* interacciona con citoquininas para el establecimiento y mantenimiento la actividad meristemática (Jasinski *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta estas consideraciones, nosotros pensamos que el silenciamiento de los genes *CLV3* y *FIN* podría incrementar el potencial morfogénico de las plantas transgénicas. Los resultados confirmaron la hipótesis, y en este sentido, nuestras líneas (especialmente las que tienen silenciado el gen *CLV3*) exhibieron mayor potencial morfogénico que los respectivos controles (i.e. p73 y Moneymaker).

El principal objetivo de este trabajo de investigación, como se comentaba anteriormente, ha sido evaluar el impacto de los genes *CLV3* y *FIN* en dos variedades diferentes de tomate, principalmente sobre caracteres relacionados con la producción. Xu *et al.*, (2015) demostraron que mutaciones en los genes *CLV3* y *FIN* de tomate promueven el desarrollo de un mayor número de órganos florales y frutos multiloculados. En este trabajo se quería saber si el incremento en el número de lóculos de los

frutos y, por tanto, del tamaño de los frutos, conduciría a un aumento de la producción por planta. Se ha podido comprobar que las líneas de silenciamiento del gen *FIN* producen significativamente menos que las plantas WT independientemente del fondo genético en el que se produce el silenciamiento (i.e. p73 o MoneyMaker). En las dos variedades de tomate, el peso de los frutos producidos por las plantas Ri-*FIN* fue significativamente menor que el de los frutos WT. En nuestra opinión, el menor peso de los frutos y, por ende, la menor producción, se debe a los efectos pleiotrópicos que ocasiona el silenciamiento de *FIN* en las hojas de las plantas transgénicas. En este sentido, las hojas desarrolladas de las plantas transgénicas con el gen *FIN* silenciado suelen exhibir síntomas prematuros de senescencia y terminan secándose a los pocos días. La ausencia de actividad fotosintética en estas hojas (principales órganos fuente) debe limitar la producción y el flujo de fotoasimilados a los frutos (principales sumideros de la planta); lo que conduce a la formación de frutos de menor calibre en estas plantas. Como se ha descrito en un párrafo anterior, el gen *FIN* codifica una hidroxiprolina O-arabinosiltransferasa (HPAT). En Arabodiposis se ha descrito que mutaciones de pérdida de función en genes que codifican para HPAT (especialmente en el doble mutante *hpat1-1 hpat2-1*, ya que el mutante simple no genera un fenotipo obvio) dan lugar a fenotipos pleiotrópicos que incluyen la elongación del hipocótilo, defectos en la formación de la pared celular, floración precoz, senescencia prematura asociada a un menor contenido en clorofila y crecimiento deficiente del tubo polínico. Según los autores, la ausencia de función de HPAT afecta a la formación de la pared celular, por lo que no se puede descartar que las hojas de nuestras plantas de tomate Ri-*FIN* tengan afectada la pared de sus células.

Sin embargo, se ha visto que las plantas silenciadas para el gen *CLV3*, tanto de p73 como de MoneyMaker, producen más que las plantas WT. Este incremento de producción se debe a un incremento del tamaño de los frutos como consecuencia del desarrollo de frutos con mayor número de lóculos. Respecto al WT, en los frutos de la línea Ri-*CLV3* de p73 se produce un incremento en el número de lóculos del 136%, mientras que en MoneyMaker se producen incrementos del 106% y 215% en los frutos de las líneas Ri-*CLV3*-4 y Ri-*CLV3*-24, respectivamente. Por otro lado, el tamaño medio de los frutos de la línea Ri-*CLV3* de p73 aumenta un 72% respecto al WT, y en los de MoneyMaker se producen incrementos del 30% y 31% en las líneas Ri-*CLV3*-4 y Ri-*CLV3*-24, respectivamente. Además, la producción de la línea Ri-*CLV3* de p73 es un 41% mayor que la del WT, mientras que la de las líneas Ri-*CLV3*-4 y Ri-*CLV3*-24 de MoneyMaker son respectivamente un 69% y 33% mayores que las del WT. Sobre la base de estos resultados es difícil saber exactamente si el silenciamiento de *CLV3* ha tenido más impacto sobre un fondo genético p73 o MoneyMaker, ya que los resultados son muy dependientes de la línea en cuestión. En este sentido, y por lo que respecta al número de lóculos, los mejores resultados se obtienen en la línea Ri-*CLV3*-24 de MoneyMaker, ya

que, para este carácter, en esta línea se consiguieron los incrementos más elevados. En relación con la producción, los mayores incrementos se consiguieron en la línea Ri-*CLV3*-4 de Moneymaker. Sin embargo, con respecto al peso medio del fruto, los mejores resultados se obtuvieron en la línea Ri-*CLV3* de p73. En este sentido, para llegar a una conclusión coherente, se tendría que disponer de más resultados sobre otras líneas y conocer los niveles de silenciamiento de este gen en cada una de las líneas. Esto daría una visión más clara sobre el impacto del silenciamiento de este gen en variedades bi- o multiloculares. Sobre la base de nuestros resultados, el silenciamiento de *CLV3* tiene un impacto positivo sobre el tamaño de los frutos y la producción tanto de plantas de p73 como de Moneymaker.

Por otra parte, los resultados de la caracterización fenotípica indican que el silenciamiento de *CLV3* reduce significativamente la tasa de cuajado de fruto. En principio, esta menor tasa de cuajado podría deberse al cuajado de un menor número de frutos consecuencia de su mayor calibre. Sin embargo, el análisis de los datos indica que esto no es así ya que en todas las líneas de silenciamiento cuajan aproximadamente los mismos frutos que en las plantas WT, o incluso más (i.e. en las plantas de la línea R-*CLV3*-4 cuajaron, de media, dos frutos más que en las plantas WT). La razón por la cual disminuye significativamente la tasa de cuajado radica en el elevado número de flores de las líneas de silenciamiento. Según Xu *et al.*, (2015), la ausencia de función en el gen *CLV3* de tomate promueve la formación de inflorescencias más ramificadas, debido a un mayor tamaño de los meristemas de inflorescencia. Por tanto, una mayor ramificación de la inflorescencia se traduce en un mayor número de flores por inflorescencia. Se ha comprobado que las líneas de silenciamiento de *CLV3* en el fondo genético Moneymaker desarrollan inflorescencias más ramificadas y con mayor número de flores. Sin embargo, esto no ocurrió en la línea Ri-*CLV3* de p73, en la que el número de flores por inflorescencia fue similar al de las plantas WT. Por el momento, se desconoce por qué en esta línea de p73 no se ha observado la ramificación de la inflorescencia. En el laboratorio se van a evaluar más líneas de silenciamiento de p73 para saber si la ausencia de ramificación de la inflorescencia es dependiente de este fondo genético que contiene la mutación *lc*.

En definitiva, los resultados de este trabajo de investigación han permitido comprobar que el silenciamiento de *FIN* conduce a la producción de frutos de tomate de menor tamaño y, por ende, a una menor producción por planta consecuencia de los efectos pleiotrópicos que ocasiona la mutación sobre las hojas fotosintéticamente activas. Por el contrario, se ha comprobado que el silenciamiento de *CLV3* incrementa la producción de tomate por planta como consecuencia del cuajado de frutos de mayor calibre y con un mayor número de lóculos. Estos resultados se han observado de forma consistente en una variedad de tomate que produce frutos biloculares (Moneymaker), y en otra que produce frutos multiloculares (i.e. p73).

## 6. CONCLUSIONES

---



## 6. CONCLUSIONES

---

Los resultados de este trabajo de investigación han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. La caracterización fenotípica de las líneas de silenciamiento en condiciones de cultivo *in vitro* ha indicado que: i) el silenciamiento de los genes *FIN* y *CLV3* promueve un incremento de la respuesta morfogénica en los dos cultivares de tomate (i.e. p73 y Moneymaker), siendo *CLV3* el gen que tiene mayor impacto sobre el incremento de esta respuesta, ii) la arquitectura vegetativa y radicular de las plantas axénicas no parece aparentemente verse afectada como consecuencia del silenciamiento de estos genes, y iii) las plántulas de una de las líneas con el gen *CLV3* silenciado desarrollan durante las primeras semanas de crecimiento un número significativamente mayor de raíces laterales, lo que podría estar relacionado con una mayor actividad meristemática consecuencia del silenciamiento de este gen.
2. Los experimentos realizados tanto en condiciones de cultivo *in vitro* como en invernadero han hecho factible la identificación de dos mutaciones, una de ellas conduce a letalidad en estadio de plántula, y la otra afecta a caracteres del desarrollo reproductivo. En relación con esta última, las plantas mutantes exhiben floración tardía, ramificación de las inflorescencias y alteraciones relacionadas con el cuajado y desarrollo de los frutos. Los resultados de la caracterización fenotípica sugieren que esta mutación podría ser de tipo insercional.
3. La caracterización fenotípica de las líneas de silenciamiento en invernadero ha revelado que: i) el silenciamiento de *CLV3* o *FIN* en las dos variedades de tomate no tiene efectos claros sobre la arquitectura vegetativa de las plantas, ii) en Moneymaker, la menor actividad transcripcional de estos genes conduce al desarrollo de flores con mayor número de verticilos; sin embargo, en p73, sólo el silenciamiento de *CLV3* conduce a un incremento del número de verticilos florales, iii) el silenciamiento de *FIN* tiene efectos pleiotrópicos sobre el desarrollo de las hojas, que afectan, consecuencia del efecto fuente-sumidero, a la producción de las plantas transgénicas, y iv) el aumento de tamaño de los frutos que se desarrollan en plantas con el gen *CLV3* silenciado, consecuencia de un incremento en el número de lóculos, conduce a una producción significativamente mayor.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---



## 7. BIBLIOGRAFÍA

---

- Azzi, L., Deluche, C., Gévaudant, F., Frangne, N., Delmas, F., Hernould, M., y Chevalier, C. (2015). Fruit growth-related genes in tomato. *Journal of experimental botany*, 66(4), pp.1075-1086.
- Bleckmann, A., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C. y Simon, R. (2009). Stem cell signaling in *Arabidopsis* requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiology*, 152(1), pp.166-176.
- Bowman, J. L., & Eshed, Y. (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in plant science*, 5(3), pp.110-115.
- Brand, U. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science*, 289(5479), pp.617-619.
- Brand, U., Fletcher, J., Hobe, M., Meyerowitz, E. y Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science*, 289(5479), pp.617-619.
- Chakrabarti, M., Zhang, N. A., Sauvage, C., Muños, S., Blanca, J., Cañizares, J., ... y Causse, M. (2013). A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(42), pp.17125-17130.
- Clark, S., Running, M. y Meyerowitz, E. (1995). *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development*, 121(7), pp.2057-2067.
- DeCandolle, A. V. (1886). Origin of Cultivated Plants. *American edition*, 107.
- Díez, M. J., y Nuez, F. (2008). Tomato. *Vegetables II*, pp.249-323.
- Fletcher, J. (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science*, 283(5409), pp.1911-1914.
- Fletcher, J. (2002). Shoot and floral meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), pp.45-66.
- Fletcher, J. y Meyerowitz, E. (2000). Cell signaling within the shoot meristem. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(1), pp.23-30.
- Grandillo, S., Ku, H. M., y Tanksley, S. D. (1999). Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(6), pp.978-987.
- Guilandini, M. 1572. *Papyrus hoc est comentarius in tria C. Plinii maioris de papyro capita*. Venice.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., ... y Tsiantis, M. (2005). *KNOX* action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology*, 15(17), pp.1560-1565.
- Jenkins, J. A. (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2(4), pp.379-392.
- Labate, J. A., Grandillo, S., Fulton, T., Muños, S., Caicedo, A. L., Peralta, I., ... y Francis, D. (2007). Tomato. *Vegetables*, pp.1-125.

- Lin, T., Zhu, G., Zhang, J., Xu, X., Yu, Q., Zheng, Z., ... y Huang, Z. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature genetics*, 46(11), pp.1220.
- Liu, J., Cong, B., y Tanksley, S. D. (2003). Generation and analysis of an artificial gene dosage series in tomato to study the mechanisms by which the cloned quantitative trait locus *FW2.2* controls fruit size. *Plant physiology*, 132(1), pp.292-299.
- MacAlister, C., Ortiz-Ramírez, C., Becker, J., Feijó, J. y Lippman, Z. (2016). Hydroxyproline O-arabinosyltransferase mutants oppositely alter tip growth in *Arabidopsis thaliana* and *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*, 85(2), pp.193-208.
- Miller, J. C., y Tanksley, S. D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and applied genetics*, 80(4), pp.437-448.
- Müller, R., Bleckmann, A. y Simon, R. (2008). The receptor kinase *CORYNE* of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal *CLAVATA3* independently of *CLAVATA1*. *The Plant Cell*, 20(4), pp.934-946.
- Muños, S., Ranc, N., Botton, E., Bérard, A., Rolland, S., Duffé, P., ... y Brunel, D. (2011). Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near *WUSCHEL*. *Plant Physiology*, 156(4), pp.2244-2254.
- Nakazato, T., Warren, D. L., y Moyle, L. C. (2010). Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American Journal of Botany*, 97(4), pp.680-693.
- Ogawa-Ohnishi, M., Matsushita, W. y Matsubayashi, Y. (2013). Identification of three hydroxyproline O-arabinosyltransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology*, 9(11), pp.726-730.
- Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y. (2009). A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology*, 5(8), pp.578-580.
- Peralta, I. E., y Spooner, D. M. (2000). Classification of wild tomatoes: a review. *Kurtziana*, 28(1), pp.45-54.
- Peralta, I., Knapp, S., y Spooner, D. (2006). The taxonomy of tomatoes: a revision of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.) and their outgroup relatives (*Solanum* sections *Juglandifolium* (Rydb.) Child and *Lycopersicoides* (Child) Peralta). *Systematic Botany Monographs*, 84, pp.1-186.
- Rodríguez, G. R., Muños, S., Anderson, C., Sim, S. C., Michel, A., Causse, M., ... y van der Knaap, E. (2011). Distribution of *SUN*, *OVATE*, *LC*, and *FAS* in the tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. *Plant physiology*, 156(1), pp.275-285.
- Rojo, E., Sharma, V., Kovaleva, V., Raikhel, N. y Fletcher, J. (2002). *CLV3* is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* *CLAVATA* stem cell signaling pathway. *The Plant Cell*, 14(5), pp.969-977.
- Sahagún, B. D. (1938). Historia general de las cosas de Nueva España (No. 04; C, F1219 S3.).
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K., Jürgens, G. y 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(6), pp.635-644.

---

Sicard, A., Petit, J., Mouras, A., Chevalier, C. y Hernould, M. (2008). Meristem activity during flower and ovule development in tomato is controlled by the mini zinc finger gene *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY*. *The Plant Journal*, 55(3), pp.415-427.

Somssich, M., Je, B., Simon, R. y Jackson, D. (2016). CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development*, 143(18), pp.3238-3248.

Soyars, C., James, S. y Nimchuk, Z. (2016). Ready, aim, shoot: stem cell regulation of the shoot apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology*, 29, pp.163-168.

Tanksley, S. D. (2004). The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The plant cell*, 16(suppl 1), S.181-189.

Van der Knaap, E., y Tanksley, S. D. (2001). Identification and characterization of a novel locus controlling early fruit development in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(2-3), 353-358.

Xu, C., Liberatore, K., MacAlister, C., Huang, Z., Chu, Y., Jiang, K., Brooks, C., Ogawa-Ohnishi, M., Xiong, G., Pauly, M., Van Eck, J., Matsubayashi, Y., van der Knaap, E. y Lippman, Z. (2015). A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics*, 47(7), pp.784-792.

Yadav, R., Perales, M., Gruel, J., Girke, T., Jonsson, H. y Reddy, G. (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes & Development*, 25(19), pp.2025-2030.