

ÍNDICE

ABREVIATURAS	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
1 EL TOMATE	3
1.1 Taxonomía	3
1.2 Características generales.....	3
1.3 La flor.....	4
1.4 Características del fruto	5
2 CUAJADO Y DESARROLLO DEL FRUTO	7
2.1 Regulación hormonal durante el cuajado del fruto	9
2.2 Genes de identidad floral relacionados con el cuajado del fruto	14
2.3 Partenocarpia	16
3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PLANTAS.....	18
3.1 Factores de Transcripción tipo DOF	18
4 EL TOMATE COMO SISTEMA EXPERIMENTAL PARA ESTUDIOS DE DESARROLLO	19
II. OBJETIVOS	21
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
1 MATERIAL VEGETAL Y SU MANIPULACIÓN	27
1.1 Material vegetal	27
1.2 Condiciones de cultivo.....	27
1.3 TRATAMIENTOS.....	28
2 PROCESAMIENTO DE MATERIAL VEGETAL PARA MICROSCOPÍA	29
2.1 Fijación de tejido vegetal.....	29
2.2 Inclusión de tejido vegetal en resina y tinción con toluidina	29
2.3 Inclusión de tejido vegetal en parafina	29
2.4 Clareado de tejidos.....	30
3 MICROSCOPÍA.....	31
3.1 Microscopía estereoscópica	31
3.2 Microscopía óptica	31
3.3 Microscopía confocal.....	31
3.4 Criomicroscopía electrónica de barrido	31
4 MICROORGANISMOS.....	31
4.1 Bacterias	31

4.2	Medio de cultivo para bacterias.....	32
4.3	Transformación de cepas bacterianas.....	32
5	PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	32
5.1	Extracción de DNA plasmídico.....	32
5.2	Extracción de DNA genómico	33
5.3	Extracción de RNA total.....	33
6	AMPLIFICACIÓN DE DNA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	33
7	ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....	34
8	DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	34
9	TÉCNICAS DE CLONACIÓN	35
9.1	Plásmidos utilizados	35
9.2	Ligación de fragmentos mediante la técnica de recombinación homóloga <i>Gateway</i> (Invitrogen™).....	35
9.3	Secuenciación	36
10	ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	36
10.1	Árbol filogenético	36
11	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN	36
11.1	RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	36
11.2	Hibridación <i>in situ</i>	38
12	ANÁLISIS <i>Southern blot</i>	40
12.1	Digestión, electroforesis y transferencia del DNA a membrana	40
12.2	Generación de la sonda marcada con dioxigenina.....	40
12.3	Prehibridación, hibridación y lavados	41
12.4	Revelado	41
13	INMUNOLocalización DE AUXINAS	41
13.1	Procesamiento de las muestras	41
13.2	Inmunodetección colorimétrica	42
14	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD GUS.....	42
15	ENSAYO DE EXPRESIÓN TRANSITORIA EN HOJAS DE <i>Nicotiana benthamiana</i>	43
16	ENSAYO DE SILENCIAMIENTO MEDIADO POR VIRUS.....	43
17	TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS DE TOMATE.....	44

17.1	Esterilización y germinación de semillas	44
17.2	Cultivo de explantes primarios.....	44
17.3	Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para la transformación.....	44
17.4	Cocultivo y lavado de explantes	45
17.5	Inducción de organogénesis.....	45
17.6	Aclimatación de plantas en invernadero.....	45
17.7	Soluciones y medios de cultivo utilizados	46
18	EVALUACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA.....	47
19	TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS.....	47
19.1	Selección de transformantes.....	48
20	EVALUACIÓN DE CARACTERES FENOTÍPICOS DEL DESARROLLO DE PLANTAS DE TOMATE	49
20.1	Análisis de viabilidad y germinación de los granos de polen de tomate	49
20.2	Características del fruto en plantas de tomate.....	49
20.3	Contenido de sólidos solubles.....	50
20.4	Acidez titulable.....	50
20.5	Índice de madurez e índice de sabor.....	50
21	CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS.....	51
22	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
23	MAPEO POSICIONAL DE LA MUTACIÓN HYDRA.....	51
23.1	Generación de la población recombinante	51
23.2	Mapeo cromosómico.....	51
23.3	Detección de polimorfismos mediante el análisis de curvas de fusión de alta resolución	53
IV.	CAPITULO I:	55
	CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE <i>hydra</i> DE TOMATE	55
	RESULTADOS	57
1	CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES ANDROESTÉRILES Y PARTENOCÁRPICOS DE TOMATE	57
1.1	Identificación de líneas mutantes	57
1.2	Análisis de complementación.....	59
1.3	Caracterización fenotípica del mutante <i>hydra</i>	61
2	BASES MOLECULARES DEL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE PLANTAS <i>hydra</i>	73
2.1	Control hormonal	73
3	MAPEO GENÉTICO DEL LOCUS <i>HYDRA</i>	85
3.1	Localización cromosómica.....	85

3.2	Mapeo fino del locus <i>HYDRA</i>	86
	DISCUSIÓN CAPÍTULO I	87
4	La mutación <i>hydra</i> causa malformaciones en la flor asociadas a la formación de frutos partenocarpicos.....	89
5	Base hormonal del fenotipo mutante <i>hydra</i>	91
6	La mutación <i>hydra</i> representa una nueva fuente de partenocarpia	95
7	Interés biotecnológico de la mutación <i>hydra</i>	96
V.	CAPITULO II:	97
	CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>SIDOF10</i> Y DE SU PAPEL EN EL CUAJADO DEL FRUTO EN TOMATE	97
	ANTECEDENTES	99
	RESULTADOS	101
1	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL UNIGEN SGN-U584226 (<i>SIDOF10</i>)	101
1.1	Análisis <i>in silico</i>	101
1.2	Localización subcelular de la proteína <i>SIDOF10</i>	106
1.3	Silenciamiento transitorio de los genes <i>SIDOF10</i> y <i>SIDOF31</i>	108
1.4	Análisis de expresión de los genes <i>SIDOF10</i> y <i>SIDOF31</i>	112
1.5	Localización del transcrito de los genes <i>SIDOF10</i> y <i>SIDOF31</i>	113
1.6	Análisis del patrón de expresión del gen <i>SIDOF10</i> mediante la línea reportera p <i>SIDOF10</i> :GUS.	115
1.7	Actividad del promotor p <i>SIDOF10</i> en el sistema heterólogo <i>Arabidopsis thaliana</i>	118
1.8	Detección de secuencias consenso de elementos reguladores en <i>cis</i> presentes en la región promotora del gen <i>SIDOF10</i>	119
2	ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN <i>SIDOF10</i>	121
2.1	Caracterización de plantas transgénicas	122
	DISCUSIÓN CAPÍTULO II	137
3	El gen <i>SIDOF10</i> codifica un factor de transcripción de tipo <i>Zinc Finger</i> , perteneciente a una familia de proteínas específica de plantas	139
4	El gen <i>SIDOF10</i> y su parálogo <i>SIDOF31</i> no tienen funciones redundantes	140
5	Regulación de la expresión del gen <i>SIDOF10</i>	140
5.1	Regulación hormonal del gen <i>SIDOF10</i>	141
6	El gen <i>SIDOF10</i> participa en el desarrollo vascular de la planta	143
7	Implicación del gen <i>SIDOF10</i> en el cuajado del fruto.....	145

VI.	CONCLUSIONES	147
VII.	BIBLIOGRAFÍA	153
VIII.	ANEXOS	164