



**UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

Identificación de genes que regulan el desarrollo del ovario y el cuajado del fruto en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Presentada por:

PILAR ROJAS GRACIA

Para optar al título de DOCTOR

Por la Universidad Politécnica de Valencia

Directores:

Dr. JOSÉ PÍO BELTRÁN PORTER

Dra. M^a CONCEPCIÓN GÓMEZ MENA

Valencia, octubre 2014



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

JOSÉ PÍO BELTRÁN PORTER, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor de Investigación del CSIC, y

M^a CONCEPCIÓN GÓMEZ MENA, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora Ramón y Cajal,

CERTIFICAN que,

El trabajo titulado “Identificación de genes que regulan el desarrollo del ovario y el cuajado del fruto en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)” Realizado por **PILAR ROJAS GRACIA** para obtener el título de DOCTOR, se ha llevado a cabo bajo nuestra dirección en el laboratorio de Biología y Biotecnología del Desarrollo Reproductivo del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica- Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 3 de septiembre de 2014.

Fdo: Dr. **JOSÉ PÍO BELTRÁN PORTER**

Fdo: Dra. **M^a CONCEPCIÓN GÓMEZ MENA**

A mis Padres
A mis hermanos
A Juan Camilo

RESUMEN

El cuajado de los frutos es un proceso importante en la reproducción de plantas angiospermas y a la vez tiene un alto impacto económico desde el punto de vista agronómico. Aunque en los últimos años se han producido avances en el conocimiento de este proceso, aún es escasa la información que se tiene. La comprensión de los mecanismos que regulan el cuajado del fruto es fundamental para el diseño de estrategias de mejora en los sistemas de producción de frutos carnosos.

El desarrollo del ovario en un fruto (cuajado del fruto) depende de que ocurra la polinización y fertilización del mismo y puede verse comprometido por condiciones ambientales desfavorables. Sin embargo, en algunas especies el cuajado del fruto puede desacoplarse de la fertilización generando así frutos sin semillas (partenocárpicos). La partenocarpia es, por tanto, una herramienta valiosa para dilucidar las bases genéticas y moleculares que controlan el proceso de cuajado del fruto. En los últimos años el tomate se ha convertido en una planta modelo para estudios de cuajado y desarrollo de frutos carnosos. Por ello, nos propusimos utilizar diferentes genotipos partenocárpicos de tomate para identificar nuevos genes implicados en el desarrollo temprano del ovario y en el cuajado del fruto en tomate.

En el primer capítulo del presente trabajo se muestra la caracterización del mutante partenocárpico de tomate *hydra*. Este mutante es completamente estéril ya que no desarrolla gametofitos. Sin embargo, el ovario inicia su crecimiento en ausencia de polinización y fertilización, generando así frutos partenocárpicos. El estudio de las bases moleculares responsables del fenotipo mutante reveló que durante el desarrollo floral, existe una alteración en el transporte polar de auxinas en las etapas previas a la antesis. Esta alteración se asocia con la activación de la señalización por auxinas en los estambres y la deslocalización de la hormona dentro del ovario. La pérdida de los gradientes de auxinas durante el desarrollo de la flor, posiblemente sea la causa de la ausencia de gametofitos y del cuajado del ovario en ausencia de fertilización, característico de las plantas mutantes *hydra*. Utilizando un abordaje de mapeo posicional, hemos localizado la mutación en el extremo del brazo largo del cromosoma 7.

Por otra parte, en nuestro laboratorio se han generado una serie de líneas androestériles de tomate que producen frutos partenocárpicos. A través del estudio del transcriptoma de estas plantas hemos identificado un grupo de genes inducidos durante el desarrollo autónomo del ovario. En el segundo capítulo de esta tesis se lleva a cabo la caracterización molecular de uno de estos genes (*SIDOF10*) y se estudia su papel en el proceso de cuajado del fruto de tomate. Este gen codifica un factor de transcripción que pertenece a la familia DOF (*DNA-binding with one finger*) específica de plantas. Los análisis de expresión mediante diferentes técnicas, indican que el gen *SIDOF10* se expresa en el tejido vascular a lo largo de todo el desarrollo de la planta. Concretamente en la etapa reproductiva, el transcrito de *SIDOF10* se localiza en el tejido vascular del ovario, llegando hasta el funículo del óvulo. Con el fin de caracterizar funcionalmente el gen *SIDOF10*, se generaron líneas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento. En plantas silenciadas el número de células del tejido vascular del pedicelo disminuye, mientras que en plantas de sobre-expresión el número de células aumenta. Por otra parte, en plantas donde los niveles del transcrito están reducidos, existe una disminución en el número de semillas, en el tamaño del fruto y un aumento en el desarrollo de frutos partenocárpicos. Nuestros resultados indican que el gen *SIDOF10* está involucrado en el desarrollo del tejido vascular de la planta controlando la proliferación celular y se requiere durante el desarrollo del ovario para la correcta formación del fruto y las semillas.

ABSTRACT

Fruit set is an important process in the sexual reproduction of flowering plants and also has a high economic impact from the agronomic point of view. Although in recent years, there have been advances in the understanding of this process limited information is still available. Understanding the mechanisms that regulate fruit set is essential for designing strategies to improve production systems of fleshy fruits.

The development of the ovary into a fruit (fruit set) depends on pollination and fertilization, which may be compromised by extreme environmental conditions. However, in some species, the onset of the fruit can be uncoupled from fertilization, generating seedless fruits (parthenocarpic fruits). Therefore, parthenocarpy is a valuable tool to elucidate the genetic and molecular bases that control of fruit set process. In recent years, the tomato has become a model plant for studies of fruit set and development of fleshy fruits. Therefore, we decided to use different parthenocarpic tomato genotypes to identify novel genes involved in early development of the ovary and fruit set in tomato.

In the first chapter of these work, we show the characterization of the *hydra* mutation in tomato. This mutant is completely sterile since lacks gametophytes development. However, the ovary starts growing in the absence of pollination and fertilization, generating parthenocarpic fruits. The study of the molecular basis of the mutant phenotype revealed that there is an alteration in the polar auxin transport in pre-anthesis stage during flower development. This alteration is associated with activation of signalling by auxin in the stamens and auxin delocalization into the ovary. The loss of auxin gradients during flower development, possibly is the cause of no gametophytes development and independent growing of the ovary in *hydra* mutants.

In our laboratory a series of male sterile tomato lines producing parthenocarpic fruits have been generated. Through the study of the transcriptome of these plants we have identified a group of genes induced during the autonomous development of the ovary. In the second chapter of this thesis, we present the molecular characterization of one of these genes (*SIDOF10*) and the study of its role in fruit set. This gene encodes a transcription factor that belongs to plant specific protein family DOF (DNA-binding With One Finger). The analysis of gene expression by different techniques, indicated that *SIDOF10* gene is expressed in the vascular tissue throughout the development of the plant. Particularly in the reproductive stage, the transcript of *SIDOF10* is localized in the vascular tissue of the ovary, reaching the ovule funiculus. In order to carry out the functional characterization of *SIDOF10* gene, we have generated stable transgenic lines of silencing and overexpression. The number of cells in the vascular tissue of the pedicel decreases in silenced plants, while in overexpressed plants the number of cells increases. Moreover, in plants where transcript levels were reduced, there is a decrease in both, the number of seeds and fruit size, and an increase in the development of parthenocarpic fruits is observed. Our results indicate that *SIDOF10* gene is involved in the development of plant vascular tissue by controlling cell proliferation and it is necessary during ovary development for the correct formation of fruit and seeds.

RESUM

El quallat és un procés important en la reproducció de plantes angiospermes i alhora té un alt impacte econòmic des del punt de vista agronòmic. Encara que en els últims anys s'han produït avanços en el coneixement d'aquest procés, encara és escassa la informació que es té. La comprensió dels mecanismes que regulen el quallat del fruit és fonamental per al disseny d'estratègies de millora en els sistemes de producció de fruits carnosos.

El desenvolupament de l'ovari en un fruit (quallat del fruit) depèn que passi la pol·linització i fertilització del mateix i es pot veure compromès per condicions ambientals extremes. No obstant això, en algunes espècies l'inici del fruit pot desacoblar de la fertilització generant així fruits sense llavors (partenocàrpics). La partenocàrpia és, per tant, una eina valuosa per dilucidar les bases genètiques i moleculars que controlen el procés de quallat del fruit. En els últims anys la tomaca s'ha convertit en una planta model per a estudis de quallat i desenvolupament de fruits carnosos. Per això, ens vam proposar utilitzar diferents genotips partenocàrpics de tomaca per identificar nous gens implicats en el desenvolupament primerenc de l'ovari i en el quallat del fruit en tomaca.

En el primer capítol d'aquest treball es mostra la caracterització del mutant partenocàrpic de tomaca *hydra*. Aquest mutant és completament estèril ja que no desenvolupa gametòfits. No obstant això, l'ovari inicia el seu creixement en absència de pol·linització i fertilització, generant així fruits partenocàrpics. L'estudi de les bases moleculars responsables del fenotip mutant va revelar que durant el desenvolupament floral, hi ha una alteració en el transport polar d'auxines en les etapes prèvies a la antesi. Aquesta alteració s'associa amb l'activació de la senyalització per auxines en els estams i la deslocalització de l'hormona dins l'ovari. La pèrdua dels gradients de auxines durant el desenvolupament de la flor, possiblement sigui la causa de l'absència de gametòfits i del quallat de l'ovari en absència de fertilització característic de les plantes mutants *hydra*. Utilitzant un abordatge de mapeig posicional, la mutació s'ha localitzat a l'extrem del braç llarg del cromosoma 7.

D'altra banda, en el nostre laboratori s'han generat una sèrie de línies androestèrils de tomaca que produeixen fruits partenocàrpics. A través de l'estudi del transcriptoma d'aquestes plantes hem identificat un grup de gens induïts durant el desenvolupament autònom de l'ovari. En el segon capítol d'aquesta tesi es du a terme la caracterització molecular d'un d'aquests gens (*SIDOF10*) i s'estudia el seu paper en el procés de quallat del fruit de tomaca. Aquest gen codifica un factor de transcripció que pertany a la família DOF (*DNA-binding with one finger*) específica de plantes. Les anàlisis d'expressió mitjançant diferents tècniques, indiquen que el gen *SIDOF10* s'expressa en el teixit vascular al llarg de tot el desenvolupament de la planta. Concretament en l'etapa reproductiva el transcrit de *SIDOF10* es localitza en el teixit vascular de l'ovari, arribant fins al funicle de l'òvul. Per tal de caracteritzar funcionalment el gen *SIDOF10*, es van generar línies transgèniques de sobre-expressió i silenciament. En plantes silenciades el nombre de cèl·lules del teixit vascular del pedicel disminueix, mentre que en plantes de sobre-expressió el nombre de cèl·lules augmenta. D'altra banda, en plantes on els nivells del transcrit estan reduïts, hi ha una disminució en el nombre de llavors, en la mida del fruit i un augment en el desenvolupament de fruits partenocàrpics. Els nostres resultats indiquen que el gen *SIDOF10* està involucrat en el desenvolupament del teixit vascular de la planta controlant la proliferació cel·lular i es requereix durant el desenvolupament de l'ovari per a la correcta formació del fruit i les llavors.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	XIII
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	15
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.....	20
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 MICROSCOPIA.....	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 MICROSCOPIA	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	32
4.1 Bacterias.....	32

4.2	Medio de cultivo para bacterias.....	32
4.3	Transformación de cepas bacterianas.....	32
5	PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	33
5.1	Extracción de DNA plasmídico.....	33
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.....	35
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	37
11.1	RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	37
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 digoxigenina.....	41
12.3	Prehibridación, hibridación y lavados	41
12.4	Revelado	41
13	INMUNOLocalización DE AUXINAS	42
13.1	Procesamiento de las muestras	42
13.2	Inmunodetección colorimétrica	42
14	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD GUS.....	43
15	ENSAYO DE EXPRESIÓN TRANSITORIA EN HOJAS DE <i>Nicotiana benthamiana</i>	44
16	ENSAYO DE SILENCIAMIENTO MEDIADO POR VIRUS.....	44
17	TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS DE TOMATE.....	45

17.1	Esterilización y germinación de semillas	45
17.2	Cultivo de explantes primarios.....	45
17.3	Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para la transformación.....	45
17.4	Cocultivo y lavado de explantes	45
17.5	Inducción de organogénesis.....	46
17.6	Aclimatación de plantas en invernadero.....	46
17.7	Soluciones y medios de cultivo utilizados	46
18	EVALUACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA.....	48
19	TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS	48
19.1	Selección de transformantes.....	49
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	50
20.2	Características del fruto en plantas de tomate.....	50
20.3	Contenido de sólidos solubles.....	51
20.4	Acidez titulable.....	51
20.5	Índice de madurez e índice de sabor	51
21	CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS	52
22	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
23	MAPEO POSICIONAL DE LA MUTACIÓN HYDRA.....	52
23.1	Generación de la población recombinante	52
23.2	Mapeo cromosómico	52
23.3	Detección de polimorfismos mediante el análisis de curvas de fusión de alta resolución.....	54
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>	72
2.1	Control hormonal.....	72
3	MAPEO GENÉTICO DEL LOCUS <i>HYDRA</i>	84

3.1	Localización cromosómica.....	84
3.2	Mapeo fino del locus <i>HYDRA</i>	85
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. CAPÍTULO 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 <i>pSIDOF10:GUS</i>	115
1.7	Actividad del promotor <i>pSIDOF10</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>	141
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	151
VIII. ANEXOS	167
AGRADECIMIENTOS	171

ABREVIATURAS			
μM	micromolar	s	segundo
μg	microgramo	SDS	Dodecil sulfato sódico
μl	microlitro	SSC	Tampón salino de citrato sódico
μl	microlitro	T	Temperatura
μm	micrómetro	TBE	Tris-borato-EDTA
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados	Tm	Temperatura de fusión
ABA	Ácido abcísico	Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3 propanodiol
ARF	<i>AUXIN RESPONSE FACTOR</i>	UFC	Unidades Formadoras de Colonia
AuxRE	Elementos de respuesta auxinas	UV	Ultravioleta
BSA	Albúmina de suero bovino	V	Voltio
cDNA	DNA complementario	VIGS	<i>Virus Induced Gene Silencing</i>
Cks	Citoquininas		
cM	centimorgans		
cm	centímetro		
DNA	Ácido desoxirribonucleico		
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato		
EDTA	Etilen-diamino-tetraacetato sódico		
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura		
g	gramo		
GAs	Giberelinas		
h	hora		
IAA	Ácido indolacético		
kb	kilobase		
kv	Kilovoltio		
L	Litro		
LB	Luria Bertoni (medio de cultivo bacteriano)		
M	Molar		
Ma	Millones de años		
mg	miligramo		
min	minuto		
ml	mililitro		
mm	milímetro		
mM	milimolar		
MS	Medio Murashige y Skoog		
N	Normal		
nm	Nanómetro		
<i>nptII</i>	Neomicina fosfotransferasa		
PAC	Paclobutrazol		
pb	pares de bases		
PBS	Tampón fosfato		
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real		
RNA	Ácido ribonucleico		
Rnasa	Ribonucleasa		

I. INTRODUCCIÓN

1 EL TOMATE

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es originario de las zonas templadas de América, concretamente de la región andina que se extiende desde el sur de Colombia al norte de Chile, aunque parece que fue en México donde se domesticó. A lo largo del tiempo se ha convertido en una de las hortalizas más consumidas a nivel mundial, tanto en fresco como en conserva y, por tanto, presenta un alto valor económico. Actualmente se cultivan numerosas variedades e híbridos de tomate que se han ido desarrollando como respuesta a la demanda diversa que presenta el mercado. Según fuentes de la FAO, la superficie mundial del tomate (fresco y de transformación) en 2011 fue de más de 5 millones de hectáreas, con una producción de 152,4 millones de toneladas.

1.1 Taxonomía

El tomate es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las Solanáceas, a la cual pertenecen numerosas especies de importancia alimenticia (como la patata, la berenjena y el pimiento), al mismo tiempo esta familia incluye especies utilizadas como modelo para el estudio de procesos de desarrollo a nivel celular, molecular y genético (como el tabaco, la petunia y el tomate). La taxonomía aceptada para el tomate es (Foolad 2007):

REINO: Plantae

Subreino: Traqueobinta

Superdivisión: Spermatophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Suborden: Solanineae

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *lycopersicum*

1.2 Características generales

El tomate es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual. La estructura de la planta es la de un simpodio. El tallo principal forma de 6 a 12 hojas, que crecen lateralmente con una filotaxia de 2/5, antes de que la yema principal se transforme en una inflorescencia. El crecimiento subsiguiente se produce a partir de la yema axilar de la última hoja, la cual desarrolla un tallo secundario que crece como una prolongación del tallo primario y desplaza lateralmente la inflorescencia. Los sucesivos segmentos del tallo se desarrollan de forma similar, produciendo una

inflorescencia cada 3 hojas. El aspecto es el de un tallo principal, que crece de forma continua con inflorescencias internodales laterales cada 3 hojas. Cuando este proceso se repite indefinidamente los cultivares se denominan indeterminados, y presentan un porte rastrero o trepador. Los cultivares determinados tienen un crecimiento limitado que puede extenderse unos 2 m. Los segmentos sucesivos del eje principal soportan, de forma progresiva, un número inferior de hojas y terminan en una inflorescencia. El sistema de ramificación lateral, como el sistema primario, experimenta un crecimiento limitado dando a la planta un aspecto arbustivo con una simetría circular que requiere menos espacio que los cultivares indeterminados (Chamarro 2001).

En tomate como en todas las plantas superiores, el tejido vascular está organizado en un sistema unificado y continuo, sin embargo la anatomía del tejido vascular presente en raíces y tallos difiere notablemente. En la raíz los tejidos de conducción xilema y floema se distribuyen de manera radiada y alterna, mientras que en el tallo se forman haces vasculares que se ubican hacia la periferia. En tomate los haces vasculares tienen una disposición biclateral (Figura 1), lo cual hace referencia a la formación de un floema externo y un floema interno, localizados en ambos lados del xilema (Caño-Delgado *et al.* 2010).

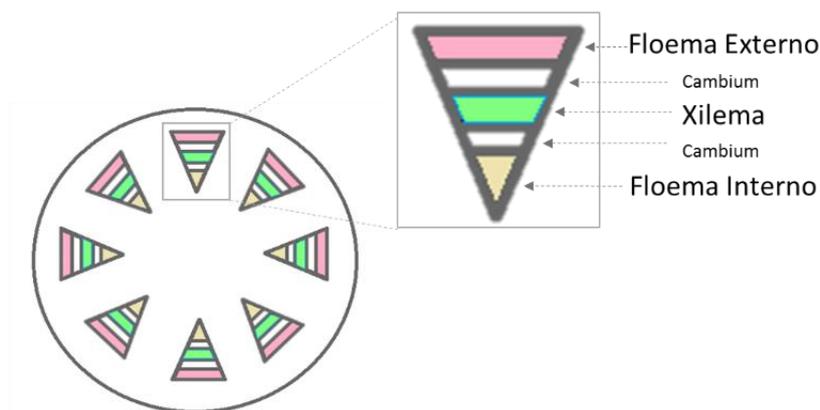


Figura 1. Representación de la organización vascular en tomate.

El tejido vascular en tomate se organiza de manera biclateral. En este tipo de organización, cada haz vascular presenta un floema externo y el floema interno, entre los cuales se desarrolla el xilema.

1.3 La flor

La flor del tomate es hermafrodita (Figura 2 A) y se encuentra unida al eje floral por un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión. Dependiendo de la variedad consta de 5 o más sépalos, 5 o más pétalos dispuestos de forma helicoidal, de un número igual de estambres que se alternan con los pétalos y de un ovario bi o plurilocular (Chamarro 2001). Los estambres están fusionados a la corola por sus filamentos, poseen anteras largas donde se desarrolla el polen que es el gametofito masculino. Las anteras son de color amarillo y están unidas adyacentemente por una serie de estructuras filamentosas que forman un cono estaminal fusionado. Dicho cono rodea

estrechamente el pistilo, lo cual favorece la autopolinización, proceso que generalmente coincide con el momento de la antesis (Picken 1984; Ho and Hewitt 1986).

La gametogénesis ocurre inmediatamente después de la esporogénesis. Las microsporas o células madre, sufren meiosis para producir tétradas de microsporas en la antera (Figura 2 B), o cuatro megasporas en el óvulo. Las microsporas, liberadas de la tétrada sufren una mitosis asimétrica para formar el polen bi-celular o gametofito masculino (McCormick 2004) (Figura 2 B). Dentro del óvulo, para el desarrollo del gametofito femenino, solo sobrevive una megaspora, denominada megaspora funcional, ésta sufre tres divisiones mitóticas, donde se obtienen 8 núcleos, cuatro en cada extremo del saco embrionario, dos núcleos migran hacia el centro para dar lugar a la célula central. Posteriormente se produce la diferenciación celular para formar un saco embrionario de siete células: tres antípodas (1n) al final de la chalaza, una célula central con dos núcleos polares (2n), dos sinérgidas (1n) y una ovocélula (1n) al final del micrópilo (Yang and Sundaresan 2000a; Drews and Yadegari 2002). (Figura 2 C y D). Las antípodas se degeneran en la mayoría de los casos antes o después de la fertilización (Christensen *et al.* 1997). Este tipo de arquitectura permite la doble fertilización con las dos células espermáticas para crear un cigoto diploide, un endospermo triploide y finalmente producir semillas viables (Chevalier *et al.* 2011).

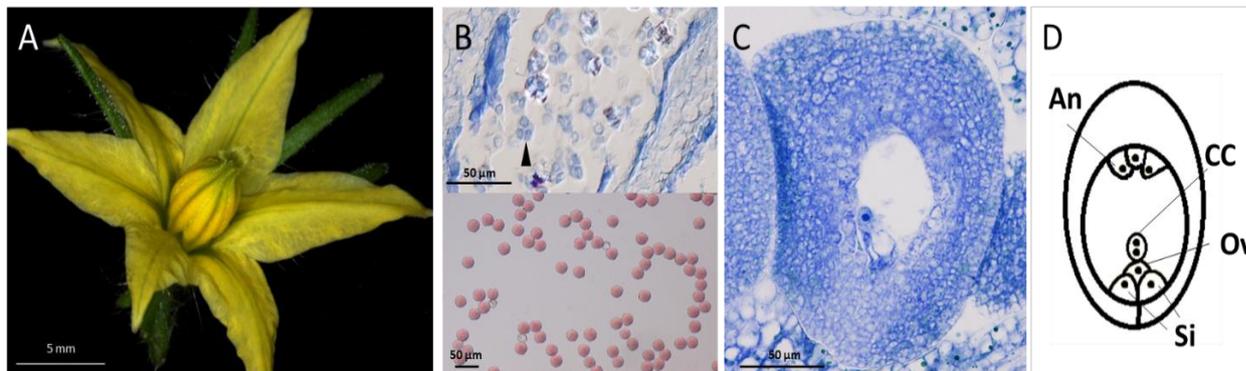


Figura 2. Flor de tomate (*Solanum lycopersicum*).

A. Flor de tomate en antesis, las anteras forman un cono estaminal con los extremos unidos formando un cuello. El estigma queda dentro del cono.

B. Panel superior: corte transversal de la antera de la flor 10 días antes de al antesis, la flecha señala una tétrada de microsporas. Panel inferior: granos de polen maduros teñidos con acetato de carmín, provenientes de flores en antesis.

C. Corte transversal del óvulo de flor en antesis, se aprecia el saco embrionario maduro.

D. Representación del saco embrionario maduro con sus siete células, tres antípodas (An), célula central (CC), ovocélula (Ov) y las dos células sinérgicas (Si).

Las barras representan 50 µm en los paneles B y C.

1.4 Características del fruto

El fruto de tomate maduro es generalmente de color rojo. Están descritas una gran diversidad de formas y tamaños de frutos que varían en función de la variedad y las condiciones de desarrollo

(Chamarro 2001). El fruto adulto de tomate está constituido, básicamente por el pericarpio, el tejido locular, la placenta y las semillas (Figura 3). El pericarpio lo componen la pared externa, las paredes radiales o septos que separan los lóculos y la pared interna o columnela. El pericarpio se origina de la pared del ovario y consta de el exocarpio, el mesocarpio parenquimático con haces vasculares y el endocarpio.

El exocarpio, está compuesto por una epidermis que no posee estomas, y varias capas subepidérmicas de tipo colenquimático. A la epidermis la cubre una fina cutícula que engrosará a medida que se desarrolla el fruto (Wilson and Sterling 1976). Esta estructura sirve como una barrera eficaz para la pérdida de agua, y en tomate es relativamente gruesa (Bargel *et al.* 2004).

El endocarpio se compone de una capa celular que delimita las cavidades loculares. Las cavidades loculares son huecos en el pericarpio y contienen las semillas, cubiertas por el tejido placentario. El tejido locular colinda con la placenta (dado que surge a partir de ésta) y comienza a expandirse durante el desarrollo dentro de los lóculos hasta rodear completamente las semillas.

Las semillas están compuestas por el embrión, el endospermo y la testa o cubierta seminal. La cubierta suele ser un tejido rígido con estructuras filamentosas que constituye la capa más externa de la semilla derivada a partir del tegumento que rodea inicialmente al óvulo (Chamarro 1995). El tegumento es un tejido de varias capas: una interna, una externa y una zona de tejido en el medio de estas dos. Su función principal es proteger al embrión y las sustancias de reserva (Esau 1976). El fruto tiene dos sistemas vasculares principales; uno que se extiende desde el pedicelo por la pared externa del pericarpio y el otro que va a las semillas a través de las paredes radiales y la columnela. El sistema vascular se compone principalmente de tubos de floema y vasos de xilema con presencia de traqueidas.

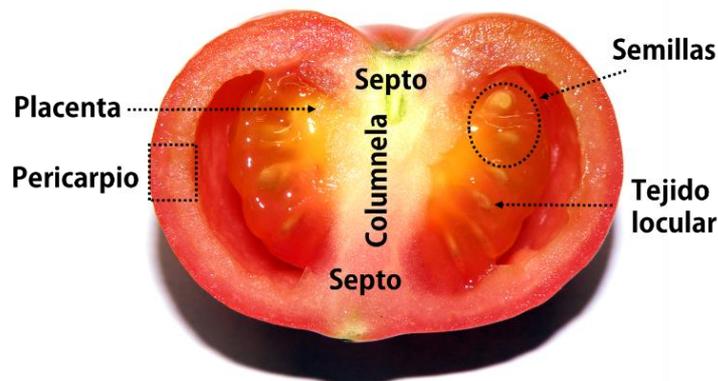


Figura 3. Corte transversal de un fruto de tomate.

Se observan el pericarpio, los septos, las semillas en contacto con la placenta rodeadas de tejido locular, y en el eje central se encuentra la columnela.

2 CUAJADO Y DESARROLLO DEL FRUTO

El proceso de fructificación es uno de los procesos del desarrollo más complejos de las plantas. El término cuajado se entiende por la reanudación del crecimiento del ovario de la flor, pasando de una condición estática a un rápido crecimiento, y depende de una exitosa polinización y fecundación de los óvulos (Gillaspy *et al.* 1993). El ciclo reproductivo en tomate es representativo de las plantas con flores (Figura 4). La **polinización** se inicia con la dehiscencia de las anteras, lo cual permite que los granos de polen alcancen el estigma, que ya es receptivo desde 1 o 2 días antes. Una vez en el estigma, los granos de polen deben germinar, y esto puede tardar entre 0,5 y 20 h. (Picken 1984).

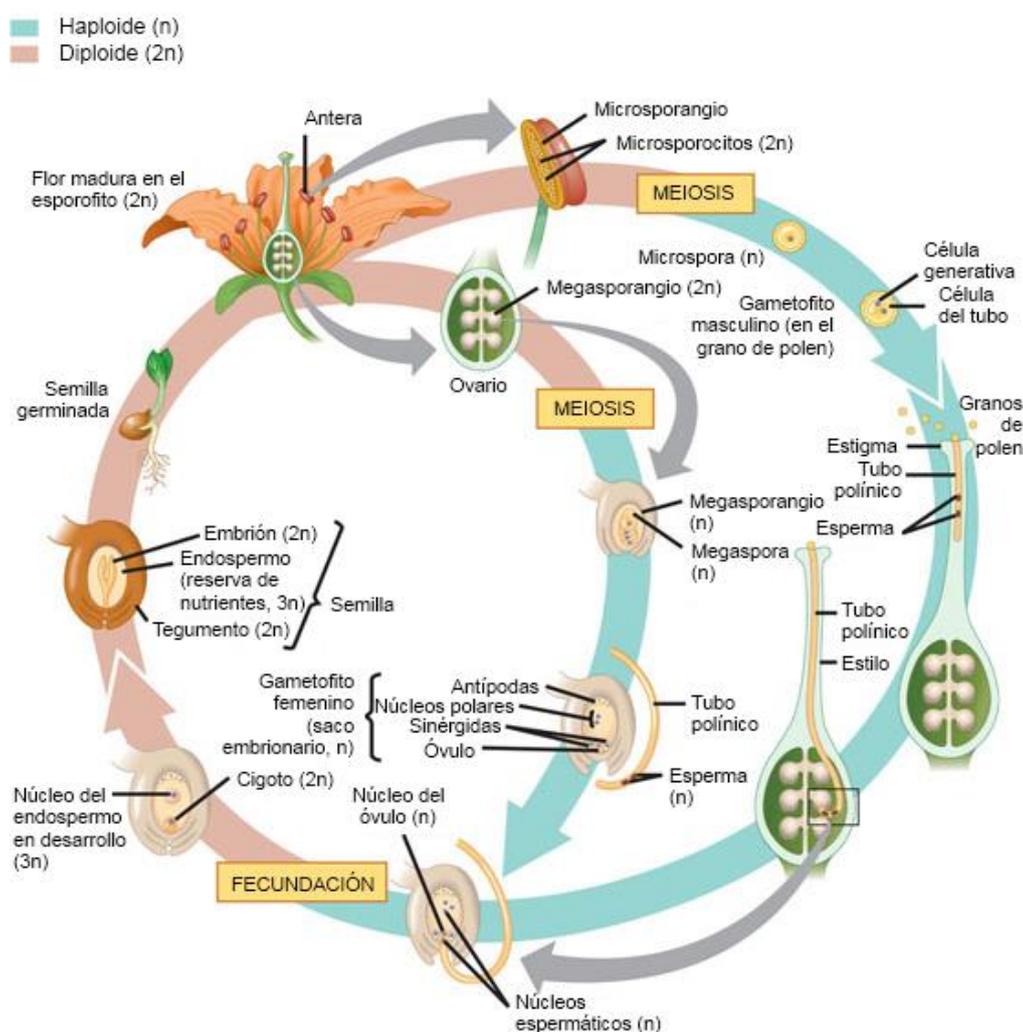


Figura 4. Ciclo de vida de una angiosperma. Adaptado de Campbell *et al.* (2001).

La **fecundación** se inicia con la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico a través del estilo. El tubo polínico penetra en el óvulo a través del micrópilo. El gametofito masculino está compuesto por dos núcleos: un núcleo vegetativo (que formará el tubo polínico al germinar en el estigma) y un núcleo generativo (que volverá a dividirse originando dos células espermáticas o

gametos masculinos). Una vez formado el tubo polínico, las dos células espermáticas descienden por él y penetran en el saco embrionario a través de una de las dos células sinérgidas, teniendo lugar la rotura del tubo polínico y la liberación de las 2 células espermáticas. Tras la migración de las células espermáticas se produce el proceso de la doble fecundación. Una célula espermática se une con la ovocélula para formar el cigoto a partir del cual se desarrollará el embrión. La otra célula espermática se une al núcleo secundario diploide para formar un núcleo triploide, el núcleo del endospermo, a partir del cual se originará el endospermo que servirá como reserva de nutrientes para el embrión (Farabee 2001). El número de óvulos fecundados en cada ovario depende del número de granos viables de polen que alcanzan el estigma y de los factores fisiológicos y ambientales durante la polinización y fecundación (Ho and Hewitt 1986). Condiciones desfavorables de temperatura pueden evitar la polinización, ya que el estrés térmico conlleva a la pérdida de viabilidad del polen (Picken 1984; Ho and Hewitt 1986). Así mismo, las malformaciones de la flor por el efecto del frío, pueden impedir la correcta polinización y fertilización (Lozano *et al.* 1998). Desde el punto de vista agronómico, esto conllevaría a una baja en la producción y por tanto pérdidas económicas considerables.

Después de los procesos de polinización y fecundación comienza el **desarrollo del fruto**. Se aprecia una primera fase que se caracteriza por numerosas divisiones celulares, que se producen mayoritariamente en tejidos del fruto como el pericarpio y el tejido placentario (Figura 5 B). En las etapas tempranas la actividad mitótica es mayor en la zona exterior del pericarpio que en la interior, las células de la columela y de la placenta muestran también alta actividad mitótica. Las semillas en desarrollo podrían controlar y mantener la tasa de divisiones celulares en el tejido locular y la placenta, ya que se ha observado que el número de óvulos fecundados determina la tasa inicial de crecimiento del ovario (Varga and Bruinsma 1986). También se sabe que existe una correlación entre el número de semillas en desarrollo y el crecimiento del fruto (Varga and Bruinsma 1986). Cuando disminuye la división celular, el fruto continúa el crecimiento a través de la expansión celular hasta que alcanza el tamaño final (Figura 5 C). Con la expansión celular el volumen de células de la placenta, del tejido locular y del mesocarpio puede aumentar más de 10 veces, mientras que las células del exocarpio y del endocarpio, que continúan dividiéndose, se expanden menos (Gillaspy *et al.* 1993). Conforme va engrosando la pared celular primaria, la vacuola ocupa la mayor proporción del volumen final de la célula y comienza a acumularse almidón, ácidos orgánicos y otras sustancias (Chamarro 1995). Finalmente ocurre la **maduración** que se caracteriza por la generación de una elevada variedad de cambios químicos y estructurales que determinan el aroma, color, textura y composición bioquímica final del fruto (Gillaspy *et al.* 1993) (Figura 5 D). Cada una de estas características son producto de modificaciones celulares y

bioquímicas diferentes. Por ejemplo, los cambios en el color son debidos a alteraciones en el contenido de clorofila, carotenoides y/o flavonoides; las variaciones en la textura son debidas a alteraciones en la turgencia de las células (Giovannoni 2004).

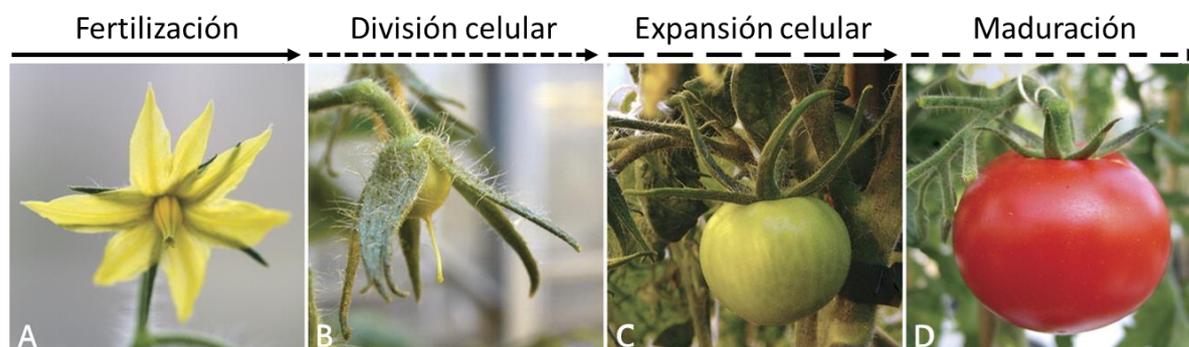


Figura 5. Desarrollo del fruto del tomate

(A) Flor polinizada y fecundada. (B) Inicio del crecimiento del fruto. Etapa de división celular, se extiende desde los 2-14 días después de la fecundación. (C) Expansión celular dura entre 6-7 semanas. (D) Maduración del fruto. (Adaptado de De Jong *et al.*, 2009).

2.1 Regulación hormonal durante el cuajado del fruto

En el proceso de cuajado y desarrollo del fruto las principales hormonas involucradas son las auxinas y las giberelinas (GAs), sin descartar la participación de otras hormonas (Mapelli *et al.* 1978; Fos *et al.* 2000; Fos *et al.* 2001). La aplicación exógena de GAs o auxinas antes de la polinización puede inducir el desarrollo del ovario en tomate generando frutos partenocárpico (Bünger-Kibler and Bangerth 1982; Alabadi *et al.* 1996). Además, existe evidencia que la interacción entre auxinas y GAs es necesaria para la coordinación del desarrollo del fruto y de las semillas (Ozga and Reinecke 2003). Es conocido que los genes de respuesta a ambas hormonas se encuentran regulados positivamente después de la polinización (Vriezen *et al.* 2008). No obstante, se ha demostrado en distintas especies que la biosíntesis de GAs está regulada por auxinas (Ross *et al.* 2001; Dorcey *et al.* 2009), por lo que es posible que la polinización induzca la señalización de auxinas y que en consecuencia se induzca la biosíntesis de giberelinas bioactivas y así se estimule el cuajado del fruto (Ozga and Reinecke 2003; Serrani *et al.* 2008). Sin embargo los mecanismos de acción de estas dos hormonas durante el cuajado y desarrollo del fruto aún se encuentran en estudio.

2.1.1 Auxinas

Las auxinas son hormonas que regulan diversos los procesos de desarrollo en las plantas, incluyendo el desarrollo del fruto. El hecho de que el suplemento exógeno de auxinas en flores no polinizadas induzca el crecimiento del fruto en tomate y en otras especies vegetales, sugiere que estas hormonas pueden activar las señales que se desencadenan a partir de la polinización y

fertilización. Ésta hipótesis además se sustenta con el hecho de que existe un incremento en los niveles de auxinas en los órganos florales después de la fertilización de los óvulos (Gillaspy *et al.* 1993). Los análisis moleculares apuntan a que el crecimiento del ovario se detiene antes de la polinización y que las auxinas están involucradas en la des-represión del crecimiento del ovario después de la fertilización (Pandolfini *et al.* 2007).

Las auxinas son sintetizadas en meristemas y hojas jóvenes y son transportadas de manera polar hacia las otras partes de la planta. Se conoce que la regulación transcripcional dependiente de auxinas durante el desarrollo de las plantas está mediada por proteínas pertenecientes a dos familias génicas, Factores de Respuesta a Auxinas (ARF por sus siglas en inglés) y proteínas Aux/IAA (Wang *et al.* 2005; Serrani *et al.* 2007a; Guillon *et al.* 2008; Vriezen *et al.* 2008; de Jong *et al.* 2009a; de Jong *et al.* 2009b). Las Aux/IAA son proteínas de vida corta que forman heterodímeros con ARFs. Los ARFs son factores de transcripción que se unen a los elementos de respuesta a auxinas (AuxREs por sus siglas en inglés) en la secuencia promotora de los genes de respuesta auxinas, donde se encuentran activando o reprimiendo la respuesta. La formación de heterodímeros entre proteínas Aux/IAA y ARF hace que se reprima la regulación por parte de los ARF. La degradación de las proteínas Aux/IAA se regula por la presencia de auxinas, lo cual hace que se promueva la ubiquitinación de estas proteínas por el complejo SCF (Skp1/Cullin/F-box), lo que conduce a su degradación por el proteosoma 26S. La ruptura de la unión entre las proteínas Aux/IAA y ARF permite la modulación de los genes de respuesta a auxinas (Pandolfini *et al.* 2007). En las primeras etapas de desarrollo del fruto en tomate, este tipo de proteínas están representadas por IAA9, ARF7 y ARF8. La disminución de los niveles de IAA9 y ARF7 genera plantas que producen frutos sin semillas, lo que sugiere que ambos genes codifican reguladores negativos del fruto (Wang *et al.* 2005). En el 2007 Goetz y colaboradores determinaron que la introducción de formas aberrantes de ARF8 puede inducir el desarrollo de frutos partenocárpicos en *Arabidopsis* y tomate, sugiriendo que ARF8 está también involucrado en la regulación del cuajado del fruto en tomate.

Existen dos modelos que explican cómo estos genes podrían estar actuando en la señalización por auxinas (Ver figura 6). En el primer modelo IAA9 y ARF8 interactúan para formar un complejo regulador, que podría estar bloqueando la transcripción de genes directa o indirectamente, previniendo así que ARF8 actúe como un activador transcripcional (Goetz *et al.* 2007). En el segundo modelo, ARF7 activa los genes represores de la respuesta auxinas que previenen el cuajado del fruto. Después de la polinización el rol de ARF7 no es requerido y hay un descenso en

los niveles del transcrito, la actividad de las proteínas ARF7 que aún están presentes pueden ser inhibidas por proteínas Aux/IAAs (posiblemente sea IAA9) (de Jong *et al.* 2009b).

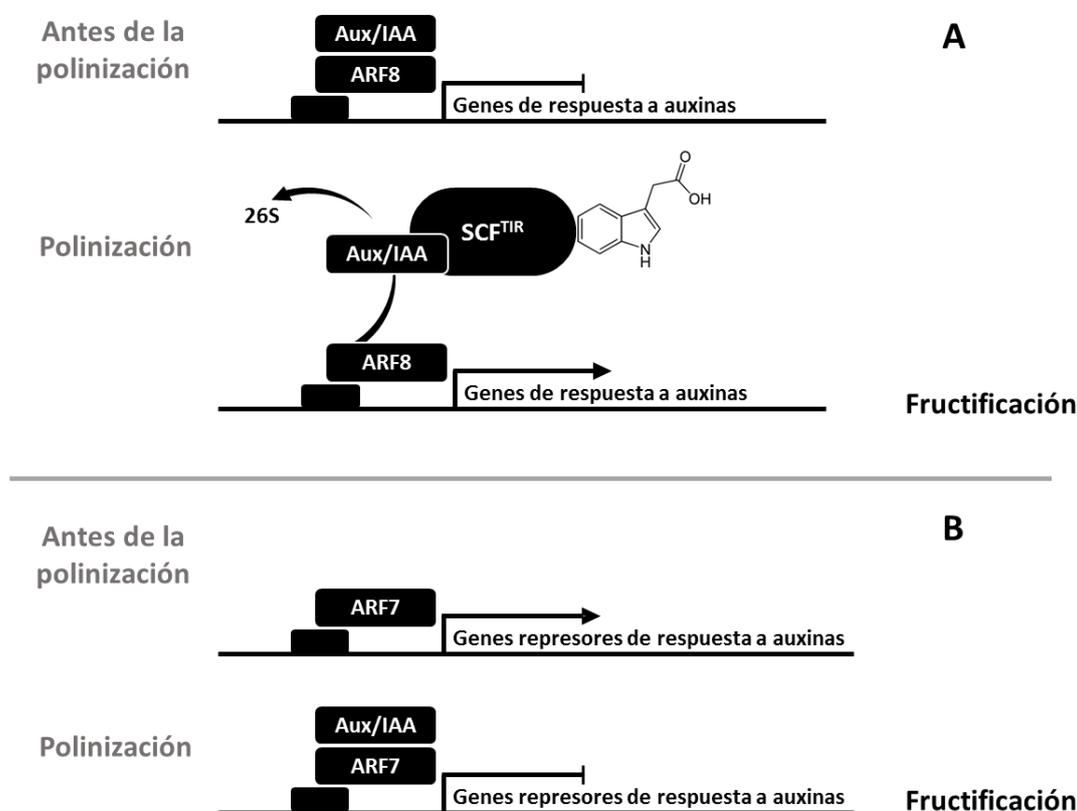


Figura 6. Modelos explicativos que muestran el papel de ARF8 y ARF7 en la fructificación (Adaptado de De Jong *et al.*, 2009).

A. Previo a la polinización las proteínas Aux/IAA y ARF8 forman un complejo que se une al promotor de los genes de respuesta a auxinas, impidiendo la transcripción. Tras la polinización, los niveles de auxinas se incrementan y las proteínas Aux/IAA son ubiquitinadas y rápidamente degradadas por el proteosoma 26S. De esta manera se libera el bloqueo y ARF8 activa los genes de respuesta a auxinas y la fructificación.

B. Previo a la polinización ARF7 activa los genes represores de la respuesta a auxinas impidiendo la fructificación. Una vez ocurre la polinización y fertilización, el nivel de transcritos del gen ARF7 y las proteínas ARF7 disminuyen. La actividad de las proteínas ARF7 que aún están presentes son inhibidas por proteínas Aux/IAAs, lo cual reduce la expresión de los genes represores de la respuesta auxinas permitiendo así que se lleve a cabo la fructificación.

El transporte polar de auxinas es un mecanismo regulador clave para la distribución espacio temporal de la hormona (Gillaspy *et al.* 1993; Sundberg and Ostergaard 2009). La dirección del transporte de auxinas a través de los órganos y tejidos, está en gran parte controlado por las familias proteicas AUX/LAX y PIN-FORMED (PIN), las cuales facilitan el flujo celular de entrada y salida de auxinas respectivamente (Petrášek and Friml 2009; Vanneste and Friml 2009; Pattison *et al.* 2014). Su distribución asimétrica a través de las células y los tejidos tiene como resultado el flujo direccional de la auxina y el establecimiento de gradientes (Wiśniewska *et al.* 2006; Bainbridge *et al.* 2008; Swarup *et al.* 2008; Petrášek and Friml 2009). En tomate se han encontrado 10 genes PIN y 5 genes AUX/LAX (Pattison and Catalá 2012). Durante el desarrollo del

fruto, la mayoría de estos genes en tomate se expresan principalmente en el fruto inmaduro y predominantemente en los tejidos internos entre las semillas y el pericarpio (Revisado por Pattison *et al.* 2014). Existen estudios que indican como los genes *SIPIN1*, *SIPIN2* y *SIPIN4*, juegan un papel importante en el desarrollo reproductivo en tomate. En el caso de los genes *SIPIN1* y *2*, la expresión en ovarios se detecta inmediatamente después de la antesis y el transcrito de cada gen se localiza en el fruto y en los óvulos respectivamente, sugiriendo que estos dos genes están involucrados en las etapas tempranas de desarrollo del fruto (Nishio *et al.* 2010). Otros estudios muestran que el gen *SIPIN4* presenta altos niveles de expresión en flores y en los primeros estadios de desarrollo del fruto (Mounet *et al.* 2012; Pattison and Catalá 2012). El silenciamiento del gen *SIPIN4* mediante RNAi de interferencia en plantas de tomate, es capaz de inducir la partenocarpia, debido a un exceso de acumulación de auxinas dentro del ovario (Mounet *et al.* 2012).

2.1.2 Giberelinas

Las Giberelinas (GAs) son ácidos diterpenos tetracíclicos naturales, cuya estructura básica está constituida por un anillo de ent-giberelano, algunas de las cuales poseen actividad hormonal (Talón 2000). Las GAs actúan como reguladores endógenos del crecimiento controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas incluyendo germinación de semillas, elongación del tallo, expansión de las hojas, desarrollo de los tricomas, y la inducción de la floración y el cuajado del fruto (Olszewski *et al.* 2002; Achard and Genschik 2009). Por esta razón el metabolismo de estas hormonas ha sido ampliamente estudiado.

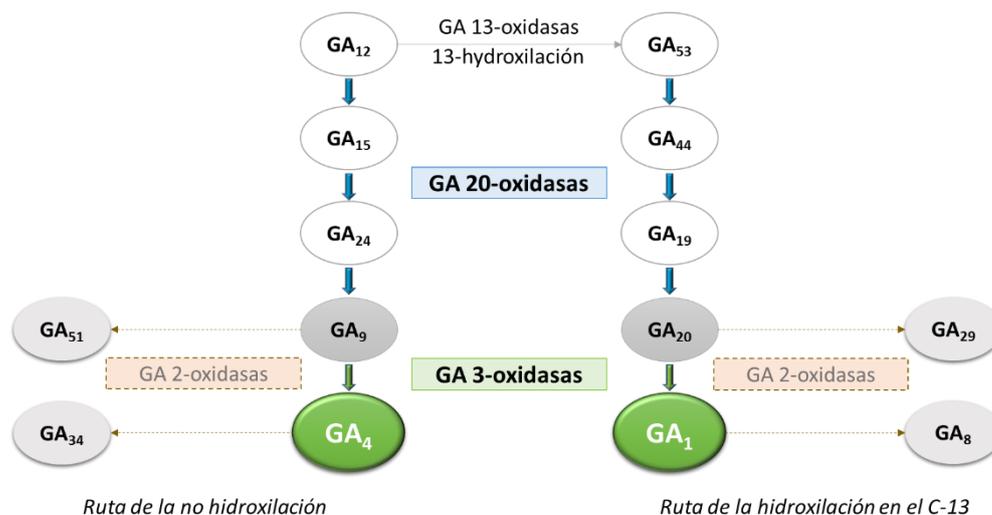


Figura 7. Esquema de la tercera etapa de la ruta biosintética de giberelinas

La biosíntesis de GAs se divide en tres etapas, la primera es la síntesis de ent-kaureno a partir del geranylgeranyl-difosfato, la segunda etapa es la conversión de *ent*-kaureno en GA₁₂ o GA₅₃ por la acción de monoxigenasas del tipo P-450, en la tercera etapa, estas dos GAs son metabolizadas por las enzimas GA 20-oxidadas y GA 3-oxidadas actuando consecutivamente para activar las GAs a través de dos rutas paralelas, ruta de la no hidroxilación temprana en el C-13 y la ruta de la hidroxilación temprana en el C-13, las cuales dan lugar a las giberelinas activas GA₄ y GA₁ respectivamente (Figura 7). A su vez las GAs activas y sus precursores pueden ser inactivados irreversiblemente por las enzimas GA 2-oxidadas (Sponsel and Hedden 2004; Rieu *et al.* 2008) (Figura 7). La mayoría de los genes de la tercera etapa del metabolismo de GAs han sido clonados en diferentes especies (Hedden and Kamiya 1997; Hedden and Phillips 2000; Sponsel and Hedden 2004; Yamaguchi 2008). Específicamente en tomate se han reportado al menos cuatro *GA20ox*, dos *GA3ox*, y cinco *GA2ox* genes (Serrani *et al.* 2007b).

Algunos genes implicados en la tercera etapa de la síntesis de GAs son *SIGA20ox1*, *SIGA20ox2*, y *SIGA20ox3*. Estos genes presentan una expresión diferencial a lo largo del desarrollo floral. Durante los primeros estadios de desarrollo floral la expresión de los genes *SIGA20ox1* en ovarios es casi indetectable, en el caso de *SIGA20ox2* la expresión más alta se presenta 3 días antes de la antesis y *SIGA20ox3* está presente en ovarios a lo largo de todo el desarrollo floral, sin embargo, una vez que ocurre la polinización los niveles de transcritos para estos tres genes se incrementan considerablemente (Serrani *et al.* 2007b). En algunas plantas el incremento en los niveles de transcritos de genes *SIGA20ox* previo a la antesis se asocia con el desarrollo de frutos partenocárpicos como es el caso de las plantas *PsEND1:barnasa* y los mutantes *pat*, en los cuales estos genes se encuentran inducidos en ovarios desde etapas tempranas de desarrollo floral (Olimpieri *et al.* 2007; Medina *et al.* 2013). Además se sabe que la sobre-expresión de *GA20ox* desvía el metabolismo de GAs de la ruta de la hidroxilación temprana en el C-13 a la ruta de la no hidroxilación en el C-13, dejando un aumento en la síntesis de GA₄ en plantas de tomate, lo que induce el crecimiento de frutos partenocárpicos (García-Hurtado *et al.* 2012).

Durante la pasada década la mayoría de componentes de la ruta de señalización por GAs han sido identificados mediante rastreos genéticos en arroz y *Arabidopsis*. Dentro de los principales componentes de la ruta se encuentran las proteínas DELLA (DELLAs), las cuales son factores nucleares que directamente o en combinación con otros reguladores transcripcionales, impiden la expansión y proliferación celular. Las proteínas DELLA actúan como reguladores negativos de la ruta de señalización por GAs. Recientemente se ha propuesto un modelo en el cual las giberelinas promueven el crecimiento mediante la inducción de la degradación de proteínas DELLA vía

proteosoma, lo que conlleva a que se libere el bloqueo impuesto por este tipo de proteínas (Dill *et al.* 2001; Locascio *et al.* 2013). En tomate, hasta el momento únicamente se ha identificado una proteína DELLA. Los estudios de las plantas transgénicas de silenciamiento y del mutante *procera*, el cual tienen una mutación puntual en el gen que codifica *SIDELLA*, demuestran que esta proteína está involucrada en el cuajado del fruto, ya que la disminución en los niveles de la proteína induce el crecimiento del ovario sin necesidad de que ocurra la polinización, generando frutos partenocárpicos (Marti *et al.* 2007; Carrera *et al.* 2012).

2.1.3 Citoquininas

Las citoquininas (Cks) son hormonas que regulan varios aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta, incluyendo división celular, senescencia de la hoja, dominancia apical, formación de raíces laterales, tolerancia a estrés y señalización nutricional (Werner *et al.* 2003; Sakakibara 2006; Argueso *et al.* 2009a). A parte de esto, se ha propuesto que estas hormonas también pueden estar involucradas en el desarrollo temprano del fruto. Un estudio demostró que altos niveles de citoquininas se acumulan en los ovarios antes de la polinización y fertilización (Matsuo *et al.* 2012). Posteriormente durante el desarrollo del fruto la mayor concentración de Cks se encuentra en la semilla 5 días después de la anthesis y decrece hasta el comienzo de la maduración (Srivastava and Handa 2005). La aplicación exógena de Cks induce la formación de frutos partenocárpicos (Matsuo *et al.* 2012). Recientemente, se ha propuesto que la biosíntesis de auxinas y giberelinas puede ser controlada en parte por citoquininas. Esto se debe principalmente, a que tras la aplicación de Cks hay un incremento en la expresión de genes de biosíntesis de auxinas (*ToFZY*) y GAs (*SIGPS*, *SIGA20ox1*, *SIGA20ox2* y *SIGA3ox1*), lo que hace que se eleve la concentración de estas dos hormonas dentro del fruto y se induzca el crecimiento del fruto (Dill *et al.* 2001).

2.1.4 Otras hormonas implicadas en la fructificación

Existen también otros reguladores hormonales involucrados en el cuajado del fruto, sin embargo su papel no ha sido estudiado en profundidad. En el caso de las poliaminas, la aplicación de diversas poliaminas en el ovario de tomate produce frutos partenocárpicos (Fos *et al.* 2000), lo que sugiere que estos reguladores pudieran tener un papel durante el cuajado del fruto. Otro regulador vegetal implicado en el desarrollo del fruto es el ácido jasmónico. La caracterización del mutante de tomate *jai1* insensible al ácido jasmónico, demostró que la ruta de señalización por ácido jasmónico es importante para control maternal y el desarrollo de la semilla (Li *et al.* 2004b). Además este regulador también está implicado en la maduración del fruto, de forma que su concentración aumenta durante el proceso de maduración (Srivastava and Handa 2005).

2.2 Genes de identidad floral relacionados con el cuajado del fruto

La mayoría de los genes que determinan la identidad de órganos florales codifican factores transcripcionales pertenecientes a la familia MADS-box. Estudios recientes han demostrado que la acción de estas proteínas durante el desarrollo de la flor está íntimamente relacionada con el cuajado del fruto.

En tomate se han aislado y caracterizado varios genes MADS-box, con expresión específica en flores. El gen MADS-box de tomate *TM29* presenta homología de secuencia con los genes *SEP* de *Arabidopsis thaliana*. Su expresión se observa uniformemente en el meristemo floral en aquellas células que darán lugar a los cuatro primordios florales (Ampomah-Dwamena *et al.* 2002). Posteriormente, una vez diferenciados los primordios de los órganos florales, la expresión de *TM29* se restringe a los órganos reproductivos (estambres y carpelo). La expresión del gen *TM29* en antisentido, causa deformaciones en los tres verticilos internos de la flor y la generación de frutos partenocárpicos, al igual que su expresión ectópica. Los estudios en la caracterización de este gen concluyen que es necesario para el desarrollo y mantenimiento de la identidad de órganos florales y el desarrollo del fruto (Ampomah-Dwamena *et al.* 2002). Así mismo el gen MADS-box de tomate *TM5*, homólogo al gen *SEP3* de *Arabidopsis thaliana*, se expresa en los primordios de pétalos, estambres y carpelo de las flores de tomate (Pnueli *et al.* 1991). La reducción de expresión del gen *TM5*, causa malformaciones en pétalos, estambres y carpelo. Además, las flores transgénicas desarrollaron frecuentemente frutos partenocárpicos (Pnueli *et al.* 1994). Otro gen de tomate homólogo a los genes *SEP*, el gen *TM8*, se expresa en estadios tempranos del desarrollo de pétalos, estambres y carpelos (Pnueli *et al.* 1991). Su expresión antisentido, produce alteraciones morfológicas y cambios de identidad en los órganos florales, esterilidad masculina y femenina de las plantas, y el desarrollo partenocárpico del fruto (Lifschitz *et al.* 1993).

Existen también otros genes que juegan un rol importante en la identidad de pétalos y estambres, como el gen *STAMENLESS (SL)*, el cual es un ortólogo al gen de clase B *APETALA3* de *Arabidopsis* (Gómez *et al.* 1999; Quinet *et al.* 2014). El mutante *stamenless* desarrolla sépalos en vez de pétalos en el segundo verticilo y carpelos en lugar de estambres en el tercer verticilo. Además se ha observado que los frutos formados por este mutante carecen de semillas (Gómez *et al.* 1999). Por otra parte, TOMATO AGAMOUS 1 (*TAG1*) (Pnueli *et al.* 1994) y TOMATO AGAMOUS LIKE (*TAGL1*) (Vrebalov *et al.* 2009) están involucrados en la identidad del carpelo y el crecimiento del ovario. La asociación de transformaciones homeóticas con el desarrollo de frutos partenocárpicos no se ha observado sólo en tomate. Así, la mutación del gen de manzano *MdPI*, homólogo al gen *PISTILLATA (PI)* de *Arabidopsis thaliana*, provocó la transformación de pétalos en sépalos y de

estambres en carpelos y además la producción de frutos partenocárpicos (Yao *et al.* 2001). Todos estos resultados sugieren la posibilidad de que en estas especies los genes que intervienen en la identidad y desarrollo de los órganos florales también puedan tener otras funciones que afecten a procesos posteriores tales como el desarrollo autónomo del ovario (Mazzucato *et al.* 1998).

2.3 Partenocarpia

El proceso normal del desarrollo del fruto puede, ocasionalmente, tener lugar en ausencia de la polinización y fertilización, generando frutos partenocárpicos. La partenocarpia es el cuajado y desarrollo de un fruto sin que se desarrolle el embrión, con lo cual el ovario crece hasta obtener un fruto sin semillas. Este fenómeno puede producirse naturalmente o ser inducido de manera artificial. La partenocarpia natural se produce por causas genéticas y puede ser obligatoria o facultativa. La partenocarpia obligada está asociada a la esterilidad genética y las plantas que la poseen requieren métodos vegetativos de propagación, la partenocarpia facultativa depende de las condiciones ambientales, como temperaturas por encima de los 24°C, en estas condiciones el ovario inicia su crecimiento independiente de la polinización (Chamarro 1995; Hazra and Dutta 2010).

La partenocarpia es un carácter importante para la industria agroalimentaria por dos razones principales: Adquirir nuevas variedades de frutos sin semillas y mejorar la tasa de cuajado en condiciones ambientales desfavorables de humedad y temperatura. Debido a lo anterior, se han adoptado estrategias para conseguir la producción de frutos partenocárpicos, y una de ellas es la aplicación exógena de reguladores de crecimiento, especialmente de auxinas y GAs, aunque este tipo de tratamientos puede causar malformaciones en el fruto y en los órganos vegetativos, inhibiendo la floración y reduciendo la calidad y productividad de fruto (Martinelli *et al.* 2009). Las estrategias genéticas para la obtención de frutos partenocárpicos ofrecen métodos eficaces que involucran mutaciones específicas o la introducción de genes específicos. En general, en estas plantas obtenidas existe un desbalance hormonal en el ovario que sustituye las señales promovidas por la polinización y fertilización, permitiendo el cuajado y desarrollo del fruto.

En tomate, existen tres fuentes de partenocarpia muy conocidas, las cuales han sido ampliamente estudiadas debido a sus perspectivas de aplicación para obtener frutos sin semillas: “*Soressi*” o “*Monfavet 191*”, “*Severianin*” y “*RP75/59*”. Soressi y Salamini (1975) describieron el mutante *short anther (Sha)* en tomate. Este mutante presenta anteras cortas y produce frutos partenocárpicos (Soressi and Salamini 1975). Más adelante Philouze *et al* (1978) obtienen independientemente un mutante con el mismo fenotipo al que denominaron “*Montfavet 191*”, estas mutaciones independientes son alélicas, y el fenotipo se debe a la mutación recesiva en un

solo gen denominado *pat* (Philouze and Maisonneuve 1978). El variedad “*Severianin*” procede de un cruce interespecífico entre *L. esculentum* y *L. hirsutum* (Philouze 1983). Varios autores señalan que este mutante presenta una mutación recesiva en el gen *pat-2*. Esta variedad produce frutos partenocárpicos de tamaño y aspecto similar a los frutos con semillas cuando las condiciones de cultivo no son favorables para la producción del polen y en consecuencia para la polinización y la fertilización. Por otra parte, la línea “RP75/59” presenta partenocarpia facultativa, esta línea está constituida por dos genes recesivos, no alélicos, a los que han denominado *pat-3/pat-4* (Nuez *et al.* 1986). En estos tres sistemas genéticos, los mecanismos necesarios para el cuajado del fruto parecen estar activados antes de la polinización y fertilización. Recientes investigaciones señalan que la partenocarpia en los mutantes *pat* es el resultado del incremento de GAs endógenas en los óvulos durante el desarrollo (Fos *et al.* 2001; Johkan *et al.* 2010).

Otra forma de obtener frutos partenocárpicos es mediante transgénesis. En este sentido se han generado frutos partenocárpicos a través de la expresión óvulo-específica de los genes *iaaM* de *Agrobacterium tumefaciens* o el gen *rolB* de *Agrobacterium rhizogenes*, los cuales afectan la biosíntesis y respuesta a axinas, respectivamente (Rotino *et al.* 1997; Carmi *et al.* 2003). En el primer caso, el promotor *Deficiens Homologue 9 (DeH9)* de *Antirrhinum majus* (L.) dirige la expresión del gen *iaaM* específicamente a los óvulos. El gen *iaaM* codifica la enzima triptófano monooxigenasa que convierte el triptófano en indolacetamida. Esta sustancia no tiene actividad, pero es hidrolizada por las plantas para dar lugar al ácido indolacético (IAA), la auxina más común en plantas. Esto produce un aumento en la concentración de auxinas en los óvulos, lo que induce el desarrollo de frutos partenocárpicos en ausencia de fecundación, pero no impide el desarrollo de frutos con semillas cuando tiene lugar la polinización. Esta estrategia ha sido efectiva para la obtención de plantas partenocárpicas en tomate (Ficcadenti *et al.* 1999) y otras especies, como tabaco, berenjena (Rotino *et al.* 1997), fresa, frambuesa (Mezzetti *et al.* 2004), pepino (Yin *et al.* 2006) y vid (Costantini *et al.* 2007). Otras estrategias, como la utilización de genes implicados en la ruta de señalización hormonal podrían ser útiles para la obtención de frutos partenocárpicos (Ver apartado 2.1).

Recientemente, en nuestro laboratorio se desarrollaron plantas androestériles que producen frutos partenocárpicos, en dos variedades de tomate Micro-tom y la variedad comercial MoneyMaker (Medina *et al.* 2013). Estas plantas fueron obtenidas a partir del uso de un promotor específico de anteras PsEND1, ligado al gen citotóxico barnasa. La expresión de este gen desde los primeros estadios de desarrollo de la flor, no permite el desarrollo de las anteras, produciendo así flores androestériles. En estas plantas los ovarios inician su crecimiento sin necesidad de que ocurra la fertilización produciendo frutos partenocárpicos. Sin embargo, los ovarios de estas

plantas son completamente funcionales, por lo que pueden ser usados como parentales femeninos para la obtención de semillas. Adicionalmente, en los frutos de plantas *PsEND1:barnasa* se observó un incremento en los niveles de algunos metabolitos y compuestos volátiles que contribuyen a mejorar la calidad y valor nutricional del fruto.

3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PLANTAS

Los organismos eucariotas, entre los cuales se encuentran las plantas, han desarrollado distintos mecanismos que permiten regular la expresión génica a lo largo del desarrollo, en respuesta a señales de su entorno. El control transcripcional es uno de los mecanismos más importantes por el cual se regulan los niveles, el momento y el tejido en que se expresa un gen. Para que se inicie la transcripción de un gen se requiere la formación de un complejo de pre-iniciación (PIC: *Pre-Initiation Complex*), que consiste en la unión de la RNA-polimerasa y proteínas especializadas a la región promotora del gen. Dentro de este grupo se incluyen la proteína de unión a la caja TATA, así como factores transcripcionales que interactúan con elementos reguladores en *cis*, presentes en los promotores de sus genes diana. Estos factores se clasifican en activadores si se incrementa la expresión de un gen o represores si se disminuye la misma (Martinez 2002). La regulación de los genes eucarióticos se basa principalmente en las interacciones específicas de la RNA-polimerasa con los distintos factores transcripcionales. Un factor de transcripción dado puede desempeñar diversos papeles regulando la expresión de distintos genes en respuesta a estímulos que la planta percibe o a los propios procesos fisiológicos de la planta. A su vez los factores transcripcionales se regulan por diferentes mecanismos, entre los cuales se encuentran la autorregulación, modificaciones post-traduccionales, degradación por el proteosoma o transporte al núcleo, entre otros muchos otros (Schwechheimer *et al.* 1998). Los factores que se unen específicamente al DNA suelen contener distintos dominios funcionales responsables de: la unión específica a los elementos reguladores en *cis*, de la activación y/o represión, de las interacciones proteína-proteína y de la localización subcelular (Liu *et al.* 1999). Los dominios de unión a DNA de los factores transcripcionales están altamente conservados y esto ha permitido la clasificación de ellos en distintas familias y súper familias (Riechmann *et al.* 2000).

3.1 Factores de Transcripción tipo DOF

Dentro de los factores de transcripción existe una familia de proteínas tipo *zinc finger* o dedo de zinc que interactúan o se unen al DNA, RNA u otras proteínas. La clasificación de estas proteínas se hizo de acuerdo con el número y el orden de los residuos de cisteína e histidina que coordinan el ión Zinc (Zn^{2+}), tal como C2H2, C2HC, C2C2, C2HCC2C2, C2C2C2C2, entre otros (Ciftci-Yilmaz and Mittler 2008). Existe una familia de proteínas *zinc finger* específica de plantas de tipo C2C2

denominada DOF (*DNA-binding One Zinc Finger*) (Yanagisawa 2002; Lijavetzky *et al.* 2003; Noguero *et al.* 2013). Las proteínas que pertenecen a la familia DOF usualmente presentan dos dominios. El primero ubicado generalmente en la región N-terminal, es el dominio de unión a DNA de 52 residuos de aminoácidos que contiene una secuencia con 4 residuos de cisteína conservados Cx2Cx21Cx2C (donde X representa cualquier aminoácido) que coordinan el ión Zinc (Yanagisawa 2002). El segundo es un dominio variable implicado en la regulación transcripcional que está ubicado en la región C-terminal (Yanagisawa and Sheen 1998; Yanagisawa 2001; Diaz *et al.* 2002). El dominio DOF reconoce específicamente la secuencia AAAG (o su secuencia reversa complementaria CTTT) en la secuencia promotora de genes de plantas (Yanagisawa 2002). Además de regular la expresión génica mediante la unión a promotores de genes diana, las proteínas DOF pueden regular la transcripción a través de interacciones proteína-proteína, con la formación de homodímeros o heterodímeros (Yanagisawa 1997). Debido a esto las proteínas pertenecientes a esta familia se les considera proteínas bi-funcionales (Yanagisawa 1995; Zhang *et al.* 1995; Yanagisawa 2004). Además estas proteínas pueden ser activadoras o represoras de la transcripción (Noguero *et al.* 2013). El primer gen descrito que codifica una proteína tipo DOF se aisló de hojas de maíz (Yanagisawa and Izui 1993), y a partir de este momento se identificaron factores de transcripción DOF en muchas especies vegetales. Los genes DOF se encuentran en todas las plantas superiores, angiospermas y gimnospermas, así como en las plantas inferiores incluyendo el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y el musgo *Phycosmitrella patens* (Moreno-Risueno *et al.* 2007).

Los factores transcripcionales tipo DOF participan en la regulación de procesos biológicos únicos en plantas que representan adaptaciones importantes adquiridas durante su proceso evolutivo (Moreno-Risueno *et al.* 2007). Dentro de estos procesos se encuentran la fotosíntesis, la síntesis de proteínas de reserva en la semilla, desarrollo y germinación de la semilla, dormición, tiempo de floración, expresión de genes específicos de células guarda, entre otros (Revisado por Yanagisawa, 2002). Así mismo, se ha descrito que las proteínas DOF también están involucradas en la regulación del metabolismo del carbono (Yanagisawa 2001), regulación de la síntesis de lípidos en las semillas (Wang *et al.* 2007), la expresión de genes de la pared celular (Wei *et al.* 2010), la regulación de genes de defensa (Yanagisawa 2000; Tanaka *et al.* 2009), la respuesta a estrés abiótico (Corrales *et al.* 2014), el ciclo celular (Skirycz *et al.* 2008) y el desarrollo del tejido vascular (Gualberti *et al.* 2002; Papi *et al.* 2002; Le Hir and Bellini 2013).

4 EL TOMATE COMO SISTEMA EXPERIMENTAL PARA ESTUDIOS DE DESARROLLO

La planta modelo más estudiada en los últimos años es *Arabidopsis thaliana*, la cual ha sido clave en la búsqueda de genes reguladores que controlan el desarrollo de flores y frutos (Seymour *et al.* 2012). Sin embargo, aunque se puedan comparar el desarrollo de frutos de *Arabidopsis* con el de los frutos de especies de plantas hortícolas, existen diferencias fundamentales en su desarrollo, que hacen necesario estudiar las bases genéticas y moleculares del desarrollo de frutos carnosos en especies de interés agronómico. El tomate es un sistema experimental adecuado para el estudio de procesos de desarrollo en las especies cultivadas con frutos carnosos. Pertenece al género *Solanum*, uno de los más grandes del grupo de angiospermas, que incluye una gran cantidad de plantas anuales y perennes de diversos tipos de hábitats. Entre las características que han permitido que el tomate se utilice como especie modelo destaca el hecho de que se trata de una planta autógama diploide ($2n=24$), presenta un ciclo de vida relativamente corto, un elevado potencial reproductivo, de fácil polinización y propagación vegetativa, y su genoma es relativamente pequeño (950 Mb). El programa de secuenciación de genoma del tomate inició en el año 2004 a través del consorcio internacional Solanaceae Genome Project (SOL) y recientemente se ha obtenido la secuencia genómica del tomate. Los datos generados se encuentran disponibles en GenBank con el número de accesión AEKE00000000 (Tomato-Genome-Consortium 2012). Los estudios de esta especie han llevado a la obtención de numerosos recursos genéticos y genómicos: poblaciones cartografiadas, colecciones de ESTs, con aproximadamente 150.000 secuencias disponibles o el desarrollo de marcadores de DNA, que han sido aplicados para la construcción de mapas de ligamiento genético (Shirasawa and Hirakawa 2013). Todos los datos generados están disponibles en la base de datos de *The Sol Genomic Network* (SGN; <http://solgenomics.net/>), la cual reúne información de las especies de solanáceas (Bombarely *et al.* 2011). Adicionalmente se han puesto a punto métodos de transformación genética para esta especie (Ellul *et al.* 2003). Todas estas razones convierten al tomate en un excelente sistema experimental para el estudio del desarrollo de frutos carnosos.

II. OBJETIVOS

La fructificación, entendida como el cuajado y desarrollo del fruto, es uno de los procesos más importante de las plantas, ya que de ella dependen su reproducción y propagación. Desde el punto de vista agronómico, el cuajado del fruto representa uno de los elementos limitantes de la producción agraria. En los últimos años se han producido numerosos avances en el conocimiento de las bases moleculares del proceso de maduración del fruto de tomate (revisado por Seymour *et al.* 2013). Sin embargo, sabemos menos sobre los procesos de desarrollo del ovario y cuajado del fruto aunque son igualmente importantes tanto para la producción como para la calidad final de los frutos.

El **objetivo general** de este trabajo es la identificación y análisis funcional de genes que regulan el desarrollo del ovario y en el cuajado del fruto de tomate.

Con esto se pretende aportar información necesaria del control genético de procesos de fructificación en plantas con frutos carnosos, que servirá de base para futuros abordajes biotecnológicos de mejora del cuajado y desarrollo del fruto.

Para alcanzar el objetivo principal nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

Primero: Caracterizar genética y molecularmente un mutante estéril de tomate con desarrollo partenocárpico de frutos. Para ello, nos propusimos:

- Caracterizar el fenotipo de la línea mutante partenocárpica:
 - Estudiar el desarrollo de los estambres y el ovario de las líneas mutantes.
 - Estudiar el desarrollo del fruto de las líneas mutantes.
- Esclarecer el posible papel de las giberelinas y auxinas en el fenotipo mutante.
- Determinar la localización cromosómica de la mutación.

Segundo: Determinar cuál es el papel del gen *SIDOF10* durante el proceso de fructificación en tomate. Este gen fue identificado a partir del análisis transcriptómico del desarrollo autónomo del ovario en líneas partenocárpicas de tomate generadas en nuestro laboratorio. Los genes diferencialmente expresados se cribaron en experimentos de silenciamiento transitorio (VIGS) identificando al gen *SIDOF10* como un gen candidato a participar en el cuajado y desarrollo del fruto de tomate.

Dentro de este objetivo nos propusimos realizar la caracterización molecular y el análisis funcional del gen en plantas de tomate de acuerdo con lo siguiente:

Caracterización Molecular:

- Caracterizar *in silico* la secuencia génica y la proteína codificada por el gen *SIDOF10*.
- Determinar el patrón de expresión del gen *SIDOF10* durante el desarrollo de la planta.
- Determinar el patrón de expresión del gen *SIDOF10* en el desarrollo floral.
- Identificar posibles elementos reguladores de la expresión del gen *SIDOF10*

Análisis funcional:

- Obtener y caracterizar líneas transgénicas de sobre-expresión del gen *SIDOF10* en la variedad Micro-Tom.
- Obtener y caracterizar líneas transgénicas de pérdida de función (RNAi) del gen *SIDOF10* en la variedad Micro-Tom.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1 MATERIAL VEGETAL Y SU MANIPULACIÓN

1.1 Material vegetal

En este trabajo se utilizaron plantas de tomate pertenecientes a tres variedades diferentes, Micro-Tom, P73 y M82. Como sistema heterólogo en algunos experimentos, se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* de los ecotipos Landsberg *erecta* y Columbia.

La variedad ornamental Micro-Tom está desarrollado a partir del cruce entre las variedades Florida Basket y Ohio 4013-3 (Scott and Harbaugh 1989). Las plantas de Micro-Tom poseen un crecimiento determinado, entrenudos cortos, frutos pequeños y su desarrollo es rápido comparado con otras variedades no enanas. El fenotipo de Micro-Tom es debido a la presencia de al menos tres mutaciones, dos de las cuales han sido caracterizadas y corresponden a mutaciones puntuales en los genes *Self-pruning* (*SP*) y *Dwarf* (*D*). *SP* controla el fenotipo determinado/indeterminado de la inflorescencia. *D* codifica una 6-deoxocatasterona dehidrogenasa, de la ruta de biosíntesis de brasinosteroides y la mutación del gen *D*, conlleva la producción de hojas pequeñas, rugosas y oscuras. Además, existe otra mutación, aún no caracterizada, que causa una reducción en la longitud de los entrenudos, pero que no afecta el metabolismo de las giberelinas. A pesar de estas mutaciones que alteran enormemente la arquitectura de la planta, las estructuras reproductivas se desarrollan normalmente, lo que indica que Micro-Tom puede ser usado para investigar el cuajado y desarrollo del fruto (Martí *et al.* 2006).

La variedad P73, es una línea de tomate comercial para consumo en fresco de crecimiento indeterminado. Esta variedad ha sido empleado por el grupo del doctor Vicente Moreno (IBMCP) y Rafael lozano (UAL), para obtener una colección de mutantes de inserción por T-DNA, a partir de la cual se obtuvo la línea mutante 366-ET-73 (posteriormente *hyd-1*).

La variedad M82 proviene de la variedad comercial UC-82 (Stevens *et al.*, 1982) y presenta un crecimiento determinado que le confiere una apariencia arbustiva. Esta variedad ha sido usada por el grupo de investigación del doctor Dani Zamir (The Hebrew University of Jerusalem – Israel) para obtener una colección de mutantes por Etil Metil Sulfonato (EMS) (Menda *et al.* 2004) a partir de la cual se obtuvo la línea mutante e1450m1 (posteriormente *hyd-2*).

1.2 Condiciones de cultivo

1.2.1 Plantas de tomate

Las plantas de tomate se cultivaron en el invernadero donde se dispusieron en macetas de diferentes tamaños (dependiendo del porte de la variedad). Como sustrato se utilizó fibra de coco

y el riego se realizó dos veces al día con solución nutritiva (Tabla 1), colocando 2 goteros por maceta. Las condiciones de temperatura fueron de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ durante el día y $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante la noche. La humedad relativa en el día osciló entre 45-65% y 75-90% en la noche. Para mantener un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) la luz natural se suplementó con luz artificial mediante lámparas de vapor de mercurio de 400w.

Compuesto	Dosis (g/L)
PO_4H_3	0,15
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,82
NO_3K	0,2
SO_4K_2	0,35
SO_4Mg	0,24
BMX (Micronutrientes)	0,1

Tabla 1. Composición de la solución nutritiva utilizada en el fertirriego.

1.2.2 Plantas de Arabidopsis

Las plantas de Arabidopsis se cultivaron en macetas de 12 cm o en bandejas de alveolos, según el caso. El sustrato utilizado era una mezcla de turba, perlita y vermiculita en una proporción 1:1:1. El riego se hizo con la solución nutritiva descrita en la tabla 1. La temperatura se mantuvo en 22°C durante el día y 19°C durante la noche. Al igual que en tomate, se mantuvo un fotoperiodo de día largo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

1.3 TRATAMIENTOS

1.3.1 Tratamiento de plantas con paclobutrazol

Para inhibir la biosíntesis de giberelinas se utilizó el producto paclobutrazol (PAC) (Duchefa) a una concentración final de 10^{-5}M . Se partió de una solución madre de PAC disuelto en etanol 96%; para el tratamiento se preparó la dilución de PAC con solución nutritiva a un volumen final de 50 ml; como control negativo se adicionó la misma cantidad de etanol 96% en la solución nutritiva. El tratamiento se realizó sobre plantas que presentaban la primera inflorescencia. Cada planta se regaba, con 50 ml de la solución y el tratamiento se hizo cada tercer día hasta que las flores de la primera inflorescencia estuvieran en antesis. Finalmente, se analizó el efecto del tratamiento cuando los frutos de plantas control estaban maduros.

1.3.2 Tratamiento de ovarios con auxinas

Los ovarios de flores emasculadas dos días antes de la antesis se trataron con una solución de ácido indolacético ($3 \times 10^{-4}\text{M}$, en una mezcla de etanol 5% y Tween 80 0,1%). Se aplicaron $10\mu\text{l}$ de la solución anterior en cada ovario y como control negativo se trataron ovarios con la mezcla de

etanol 5% y tween 80 0,1%. Dos días después los ovarios se recolectaron en nitrógeno líquido. Este material ha sido utilizado para medir la expresión del gen *SIDOF10*.

2 PROCESAMIENTO DE MATERIAL VEGETAL PARA MICROSCOPIA

2.1 Fijación de tejido vegetal

Las muestras de tejido vegetal se sumergieron en una solución fijadora. Dependiendo del procedimiento se utilizó para-formaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7,2 conteniendo Tritón X-100 (0.1%), y en otros casos se utilizó FAE (50% ETOH, 5% ácido acético glacial y 4% de formaldehído). Para ayudar a la penetración del fijador se realizaron tres pulsos de vacío de 5 min cada uno, se cambió la solución por una fresca y se mantuvieron a 4°C durante 16 horas. Transcurrido el tiempo se eliminó la solución fijadora. En el caso de muestras fijadas con para-formaldehído, la solución se cambió por tampón fosfato 0.1M y se procedió a deshidratar el tejido realizando cambios de una hora en concentraciones crecientes de etanol (30, 50 y 70%). En el caso de muestras fijadas con FAE se realizó el cambio a etanol 70%. En ambos casos las muestras se mantuvieron en etanol 70% a 4°C hasta el momento de su inclusión en resina o en parafina según el procedimiento.

2.2 Inclusión de tejido vegetal en resina y tinción con toluidina

El material vegetal fijado previamente como se describió en el apartado 2.1, se incluyó en resina acrílica Technovit® 7100 (Kulzer). Para ello se realizaron cambios de 1 – 2 horas en soluciones de Resina:ETOH (v/v) incrementando poco a poco la concentración de resina (1:2, 1:1, 2:1) hasta llegar a resina pura (100%) en donde se dejaron un periodo superior a 12 horas. El montaje de muestras se realizó en cápsulas de gelatina y para la polimerización se siguieron las instrucciones de por la casa comercial. A partir de las muestras incluidas en resina se obtuvieron cortes histológicos de 2 µm de espesor utilizando cuchillas de cristal y el equipo ULTRA CUT E de *Reichert-Jung*. Los cortes se dispusieron en portaobjetos tratados con poly-lisina, se tiñeron con toluidina 0.5% durante un minuto y luego se lavaron con abundante agua. Finalmente los cortes se montaron con Merckglass (Merck®) y se visualizaron mediante microscopia óptica.

2.3 Inclusión de tejido vegetal en parafina

El tejido se fijó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.1. Para la inclusión en parafina se utilizó el procesador de tejidos (Leica TP1020) el cual se programó siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa utilizado fue el siguiente: En primer lugar las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol durante una hora cada una (70, 90, 90, 95, 95 y 100%). En la segunda concentración de 95% las muestras se tiñeron con Eosina-Y al 0,2%. Posteriormente

se sumergieron tres veces en Histo-Clear® (National Diagnostics) y finalmente se transfieren a parafina Paraplast® Plus (McCormick Scientific) fundida a 58°C aplicando vacío.

Tras la inclusión en parafina las muestras se colocaron en moldes de aluminio con parafina líquida, se cubrieron con un soporte plástico y se dejaron solidificar a 4°C. Posteriormente se realizaron los cortes histológicos de 8 o 20 µm de espesor (según el caso) utilizando un micrótopo Microm HM330, y luego se colocaron sobre portaobjetos tratados con poly-lisina.

2.4 Clareado de tejidos

2.4.1 Clareado de tejidos con la solución de Hoyer

El clareado de tejidos se realizó según el protocolo descrito por Liu & Meinke (1998) con algunas modificaciones. Esta técnica se utilizó para observar la tinción GUS en el tejido reproductivo de plantas de Arabidopsis. Los tejidos previamente fijados en FAE (ver apartado 2.1), se sumergieron en la solución de Hoyer (100 g de hidrato de cloral (Sigma); 7,5 g de góma arábiga (Sigma); 5 ml de glicerol (Sigma); en 60 ml de agua) durante al menos 48 horas. Transcurrido este tiempo las muestras se colocaron en portaobjetos y se observaron mediante microscopía óptica.

2.4.2 Tinción y clareado de óvulos

Para evaluar el desarrollo de los óvulos de plantas de tomate se utilizó el protocolo para la evaluación del saco embrionario de maíz utilizado por Dr. Junyi Chen en el laboratorio del Dr. Thomas Dresselhaus (Universidad de Regensburg, Alemania). Este protocolo se ha puesto a punto para tomate, aprovechando una beca de estancia corta concedida por ECOST (*European Cooperation in Science and Technology*).

Los ovarios de tomate se cortaron longitudinalmente y se fijaron en FAE, como se describe en el apartado 2.1. Una vez las muestras estaban en etanol 70%, se inició la hidratación en soluciones decrecientes de etanol (50, 30 y 15%) hasta llegar a agua, las muestras se mantenían 30 min en cada solución. Para permitir la tinción de los óvulos, se retiró cuidadosamente la pared del ovario, e inmediatamente se sumergieron en una solución de HCl 6N por 40 min. Tras lavar con agua durante una hora, los ovarios se trataron con ácido periódico 0,5% durante 30 min y nuevamente se lavó con agua por una hora. Transcurrido el tiempo se realizó la tinción de los óvulos con una solución de acriflavina 0,1% durante 30 min y se hicieron tres lavados con agua de una hora cada uno (incluso toda la noche). Posteriormente se deshidrató la muestra en series crecientes de etanol (30, 50, 70, 85, 95 y 100%) de 30 min cada una. Cuando las muestras estaban en etanol 100% comenzó la decoloración de los óvulos en soluciones crecientes de metil salicilato: etanol (v/v) (1:3, 1:1, 3:1), cada cambio duró mínimo 1 hora hasta llegar a metil salicilato puro, en donde

permanecieron cerca de 16 horas. Finalmente los óvulos se pusieron cuidadosamente en portaobjetos y se analizaron mediante microscopia confocal (ver apartado 3.3).

3 MICROSCOPIA

3.1 Microscopía estereoscópica

Para observar tejidos con bajo aumento (entre 5 y 20 aumentos) se utilizó una lupa binocular Leica MZ16F, que está acoplada a una cámara digital Leica DFC300 FX. Las imágenes se obtuvieron con ayuda del software LAS (*Leica Application Suite*) versión 2.6.0 R1.

3.2 Microscopía óptica

Los cortes histológicos y cortes de tejidos en fresco, se analizaron bajo el microscopio óptico Nikon Eclipse E600, en donde se utilizó iluminación de campo claro y la técnica de Normaski o D.I.C. (contraste diferencial por interferencia). El microscopio está acoplado a una cámara digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1). Las imágenes se obtuvieron con ayuda del software de análisis de imagen NIS-Elements F3.0.

3.3 Microscopía confocal

Para esta técnica se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg, Alemania), consistente en un microscopio invertido DMIR2 y una unidad espectral confocal SL con dos detectores de fluorescencia simultáneos y 4 líneas de láser (458 nm, 488 nm, 514 nm y 534 nm). Para excitar la YFP y la fluorescencia de la acriflavina, se utilizó un láser de 488 nm, y la emisión se recogió entre 500 nm y 520 nm (máximo de emisión: 509 nm). La clorofila se excitó con el mismo láser, y su emisión se recogió entre 660 nm y 690 nm. La identidad de la señal se confirmó en todos los casos mediante un barrido de longitudes de onda (λ -scan), para visualizar la intensidad de la emisión a las diferentes longitudes de onda.

3.4 Criomicroscopía electrónica de barrido

Esta técnica se utilizó para obtener imágenes en tres dimensiones y de gran resolución, de los tejidos florares de plantas de tomate. Las muestras se procesaron en el servicio de microscopía de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), donde se utilizó un microscopio electrónico de barrido JSM-5410 (JEOL) acoplado al instrumental de criomicroscopía “*CryoTrans 1500 Cryo-Preparation System*” (Oxford instruments).

4 MICROORGANISMOS

4.1 Bacterias

Las cepas bacterianas que se han utilizado en este trabajo se detallan en la tabla 2.

Microorganismo	Cepa	Método de transformación	Temperatura
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	Choque térmico	37°C
<i>Escherichia coli</i>	DH10B	Electroporación	37°C
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	Electroporación	28°C
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58	Electroporación	28°C

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas

4.2 Medio de cultivo para bacterias

Medio LB (Luria-Bertani): 1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, pH 7,0. En los casos donde se utilizaba el medio sólido se adicionaba 1,5% de agar bacteriológico (Pronadisa).

4.3 Transformación de cepas bacterianas

Para la transformación de células bacterianas se descongeló en hielo una alícuota de 40 μ L de células competentes, a la cual se le adicionó 1 μ L del plásmido llevando la construcción de interés. La cepa de *E. coli* TOP10 fue transformada siguiendo el protocolo de choque térmico proporcionado por el fabricante (Invitrogen®). En el caso de las cepas de *E. coli* DH10B y *A. tumefaciens* (LBA4404 y C58) la transformación se llevó a cabo por electroporación. Tras añadir el DNA plasmídico a la alícuota de células competentes, la mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación (BioRad®) previamente enfriada en hielo, luego se aplicó un pulso eléctrico a través del equipo Gene Pulse (BioRad®). Para la cepa DH10B las condiciones de electroporación fueron 200 Ω , 25 μ F y 1,8 kV y para *A. tumefaciens* 400 Ω , 25 μ F y 1,8 kV.

En todos los casos las células bacterianas transformadas se resuspendieron en 700 μ L de medio LB sin antibióticos, y se incubaron en agitación constante durante 1h a 37°C, para *E. coli* y 2h a 28°C para *A. tumefaciens*. Tras la incubación sin presión de selección, las células bacterianas se plaquearon en medio LB suplementado con antibiótico, con el fin de seleccionar las células transformadas.

Antibiótico	Concentración (μ g/ μ L)	
	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Espectinomicina	100	100
Rifampicina	-	100
Kanamicina	50	50

Tabla 3. Antibióticos utilizados para la selección de colonias bacterianas recombinantes.

5 PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5.1 Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción de DNA plasmídico se partió de 3 ml de cultivo crecidos durante una noche en LB suplementado con antibiótico, posteriormente se siguió el protocolo establecido de extracción y purificación de DNA plasmídico del sistema Rapid Plasmid System® de Marligen Biosciences, Inc.

5.2 Extracción de DNA genómico

Para el genotipado de las plantas, se tomaron 300 mg de hojas jóvenes, que se maceraron en 500 µL de tampón de extracción (0,2M Tris-HCL pH 9,0; 0,4 M LiCl; 25 mM EDTA; 1% v/v SDS). Tras una centrifugación de 5 min a 13.000 r.p.m., 350 µL del sobrenadante se transfirieron a un tubo eppendorf que contenía 350 µL de isopropanol y la mezcla se centrifugó por 10 min. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó con etanol al 70% (v/v) 2 veces. El sedimento se dejó secar y se resuspendió en 200 µL de agua destilada. La cuantificación se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

Para el análisis de *Southern blot* y la amplificación de fragmentos a partir de DNA genómico se utilizó el reactivo Plant DNAzol® de Invitrogen™, el cual permite obtener un DNA de mayor pureza y mejor calidad. La extracción se hizo a partir de 100 mg de tejido congelado en nitrógeno líquido, y se siguieron las instrucciones del fabricante. Finalmente la cuantificación se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

5.3 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó a partir de 100 mg de tejido vegetal congelado en nitrógeno líquido, siguiendo las instrucciones del fabricante del sistema RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). El RNA se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 a 260 nm. Posteriormente el RNA extraído se utilizó para la síntesis de cDNA necesario para los experimentos de RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

6 AMPLIFICACIÓN DE DNA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó a partir de 50 ng de DNA como molde. La mezcla de reacción contenía 0.4 µM de cada uno de los oligonucleótidos específicos del fragmento a amplificar (Tabla 4), 1 µL de dNTPs 10 mM, 5 µL de tampón de reacción 10X, 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM y 1,25 unidades de DNA polimerasa (*Biotools*®) en un volumen final de 50 µL. Las reacciones se desarrollaron en un termociclador Perkin Elmer 2.400 en las siguientes condiciones: una incubación inicial de 94°C 2 min; seguida de 30 - 35 ciclos de amplificación y una incubación final de extensión. Cada ciclo de amplificación consistió en tres etapas: la primera de

desnaturalización 94°C durante 30 s; luego una de anillamiento de 30 s a la temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos utilizados (T), la cual se consideró en función de la temperatura de fusión estimada (T_m) de cada uno de ellos (ver tabla 2); y la tercera etapa de 72°C durante 30 s que corresponde a la extensión.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	T _m (°C)	T (°C)	Uso
KAN dir	GAC AAG CCG TTT TAC GTT TG	66	58	Genotipado
KAN Rev	GAT ACT TTC TCG GCA GGA G	68	58	
M13 Dir	GTA AAA CGA CGG CCA GT	55	56	Amplificación de sondas para <i>Southern blot</i> e hibridaciones <i>in situ</i>
M13 Rev	AAC AGC TAT GAC CAT G	55	56	
SIDOF10 ORF Dir	ATG ATT CAA GAG CTG TTT GCA GG	66	58	Amplificar secuencia codificante del gen <i>SIDOF10</i>
SIDOF10 ORF Rev	TTA AAG ATA TGC CCC ATT TGC TG	65	58	
SIDOF10 -STOP Rev	AAG ATA TGC CCC ATT TGC TG	65	58	Amplificar de la secuencia codificante del gen <i>SIDOF10</i> sin el codón de parada
SIDOF10 corto Dir	CAC TTC CGT TTG AGT TTA TTG G	58	56	Amplificar fragmento para construcción VIGS e hibridación <i>in situ</i> .
SIDOF10 corto Rev	ATA TGC CCC ATT TGC TGT TGG	53	56	
P _{SIDOF} Dir	GAA GAG TGA TAA GTC CTA GTG	51	56	Amplificar región promotora del gen <i>SIDOF10</i>
P _{SIDOF} Rev	AGC AAA TGA GAT TGC TCT TGA	52		
SIDOF31 Dir	GTC CAT GCT ATT TGG TGG TG	52	56	Amplificar fragmento para construcción VIGS e hibridación <i>in situ</i> .
SIDOF31 Rev	TGA TTC AAA TTG CTC CAA GC	50	56	
T7	Servicio de secuenciación			Secuenciar insertos en pCR8

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

7 ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8-3 % (p/v) en tampón TBE 1X (Tris 0,89 M; ácido bórico 0,89 M; EDTA 2 mM (pH=8,0)), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% (p/v); azul de xilencianol 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v)) hasta una concentración final 1X y la electroforesis se realizó a voltaje constante durante el tiempo necesario. Además, los geles contenían 0,5 µg/mL de bromuro de etidio, lo que permitió visualizar el DNA tras exponer el gel a luz ultravioleta.

Para la purificación de fragmentos de DNA, las bandas se observaron bajo luz ultravioleta y se cortaron del gel con ayuda de una cuchilla. La purificación de DNA se llevó a cabo mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit® (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8 DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las digestiones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 1,5 ml con 5-10 U de la enzima / 1 µg DNA. En cada reacción la enzima iba acompañada de su respectivo tampón según las condiciones recomendadas por la casa comercial. La incubación se realizó en un termobloque Thermomixer confort (Eppendorf®) durante dos horas a 37°C. Después de la incubación, la digestión se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

9 TÉCNICAS DE CLONACIÓN

9.1 Plásmidos utilizados

En este trabajo se utilizaron distintos plásmidos en función del objetivo de cada experimento. En la tabla 5 se detalla la lista de plásmidos, con sus características, la procedencia y el uso que se le ha dado.

Plásmido	Características	Referencia/ procedencia	Uso
pCR8	<i>Spec</i> ^R ; promotor T7, sitios M13; sitios attL1 y attL2	Invitrogen™	Clonaje de fragmentos, vector de entrada a la tecnología <i>Gateway</i>
pEarleyGate101	Kan ^R ; sitios attR1 y attR2; gen reportero <i>YFP</i> .	Earley <i>et al.</i> , 2006	Fusión traduccional SIDOF10-YFP
pEarleygate104	Kan ^R ; gen reportero <i>YFP</i> ; attR1 y attR2	Earley <i>et al.</i> , 2006	Fusión traduccional YFP-SIDOF10
pTRV1	Kan ^R ; posee el RNA1 del virus TRV	Liu <i>et al.</i> , 2002	Plásmido complementario para la infección viral en el ensayo VIGS
pTRV2	Kan ^R ; posee en RNA2 del virus TRV; Sitios attR1 y attR2	Liu <i>et al.</i> , 2002	Plásmido con el fragmento del gen de interés, utilizado en el ensayo VIGS
pKGWFS7,0	<i>Spec</i> ^R ; gen reportero <i>GUS</i>	Karimi <i>et al.</i> , 2002	Fusión del promotor <i>PSIDOF10</i> al gen reportero <i>GUS</i>
pK7GWIWG2(I)	<i>Spec</i> ^R ; dos sitios attR1 y attR2 invertidos, separados por un intrón.	Karimi <i>et al.</i> , 2002	Silenciamiento del gen <i>SIDOF10</i>
pK2GW7	<i>Spec</i> ^R ; Promotor constitutivo 35S de CaMV (<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>).	Karimi <i>et al.</i> , 2002	Sobre-expresión del gen <i>SIDOF10</i>

Tabla 5. Plásmidos utilizados.

Los sitios *attL* y *attR*, son sitios de recombinación homóloga correspondientes a la tecnología *Gateway*.

^RLos antibióticos a los cuales confiere resistencia el plásmido, se indican como: espectinomicina (*Spec*), Kanamicina (kan) y ampicilina (Amp).

9.2 Ligación de fragmentos mediante la técnica de recombinación homóloga *Gateway* (Invitrogen™)

La tecnología *Gateway* se basa en las propiedades de recombinación sitio específicas del bacteriófago *lambda*, el cual contiene sitios de recombinación bien caracterizados conocidos como att (site-specific *ATT*achment). En primer lugar los productos de PCR amplificados se clonaron en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO TA® (Invitrogen™, EUA), el cual contiene las secuencias de recombinación attL1 y attL2 y dos sitios EcoRI, que flanquean el fragmento de

interés. Posteriormente, los clones obtenidos se mandaron secuenciar, para verificar su secuencia y determinar la orientación del fragmento respecto al promotor T7 del vector. Una vez se determinó la orientación del fragmento clonado, los fragmentos en la orientación adecuada se incorporaron en los vectores de destino del sistema Gateway que contiene dos lugares de recombinación attR1 y attR2 mediante una reacción de recombinación catalizada por la enzima LR Clonasa (Invitrogen™).

9.3 Secuenciación

La secuenciación de fragmentos se llevó a cabo en el servicio de secuenciación de DNA del instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia – CSIC), donde se utilizó un secuenciador capilar ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores usados se indican en la tabla 4.

10 ANALISIS DE SECUENCIAS

Para el análisis de secuencias se utilizaron distintos programas que se describen en la tabla 6.

Página web / Programa	Organización/referencia	Uso
http://www.bioinformatics.org/	Bioinformatics	Reverso complementario de secuencias
http://www.uniprot.org/	Uniprot	Alineamiento de secuencias
http://www.expasy.org/	ExPASy <i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>	Traducción de cDNA a proteína/ análisis de proteína
www.ncbi.nlm.nih.gov	<i>The National Center for Biotechnology Information</i>	BLAST, búsqueda de homología
http://bioinformatics.psb.ugent.be/	PlantCare	Búsqueda de motivos de regulación en promotor
http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/	PLACE	Búsqueda de motivos de regulación en promotor
http://www.megasoftware.net/MEGA6	Tamura <i>et al.</i> , 2013	Alineamiento y árbol filogenético

Tabla 6. Programas utilizados en este trabajo.

10.1 Árbol filogenético

Para realizar el árbol filogenético, se utilizó el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) usando el método estadístico Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), con las opciones “Poisson model” y “Pairwise deletion” habilitadas. La confiabilidad del árbol obtenido se analizó usando el análisis “bootstrap” con 1000 repeticiones. Se usaron 16 secuencias nucleotídicas de genes DOF homólogos de diferentes especies vegetales obtenidas a partir del GenBank (Tabla suplementaria 1). El árbol se enraizó usando la secuencia del gen *PaDOF* de *Picea abies*.

11 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN

11.1 RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Para el análisis de expresión de los genes en estudio se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Se diseñaron oligonucleótidos utilizando el programa Primer Express v.2.0 (Applied Biosystems™) a partir de las regiones específicas para cada gen (tabla 7).

A partir de 2 µg de RNA total previamente tratado durante 30 min con una DNasa (Turbo DNA-free de Fermentas™), se realizó la síntesis de la primera cadena del cDNA para lo cual se utilizó el sistema Primer Script RT reagent kit® (TaKaRa), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema se basa en la acción de la retrotranscriptasa de MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus), y como cebador se utiliza una mezcla de oligo(dT) y hexameros.

Gen	Oligonucleótido directo 5'-3'	Oligonucleótido Reverso 5'-3'	Referencia
<i>SIGA20ox1</i>	CTCATTGTGATCCAACATCATTAAACA	CCATAAATGTGTCGCCTATATTAACC	Martí <i>et al.</i> , 2007
<i>SIGA20ox2</i>	AAACCAGATCTTGCGTTAGGAACT	CACTGGTTGTCCATGAAAACCTTGT	Martí <i>et al.</i> , 2007
<i>SIGA20ox3</i>	TTGTCCCAAGAAAGATAAGGTGATT	GTTTGTAGGGTGTTCATATCAGCTCTATAT	Martí <i>et al.</i> , 2007
<i>SIGA3ox1</i>	CGCTCTCCTGATGGTGTCACT	TTCAGACCACATGAGCTTCGA	Martí <i>et al.</i> , 2007
<i>SIGA3ox2</i>	CGGGTTGTACCCGAGTGTTT	CCCATATAGATAGGCCACTGAAAGA	Medina <i>et al.</i> , 2013
<i>SIGA2ox1</i>	TCACCCCATGCTAGAATTTGTTG	TGGTGTGTAGTGACCAATTCTAAGG	Medina <i>et al.</i> , 2013
<i>SIGA2ox2</i>	GAAAAAATTGCAGCCTCATAATAATTT	TCCTAACATGGTGGGACTTTGTC	Medina <i>et al.</i> , 2013
<i>SIDELLA</i>	GATATGGCGGATGTTGCTCA	ACCCATAGCCATCTCAAGCTGT	Este trabajo
<i>SIIAA3</i>	AAGTTAGCATGGATGGAGCACC	AAACCTGAAGATCAATTTTCTCAA	Medina <i>et al.</i> , 2013
<i>SIIAA9</i>	GGCCACCCATTGATCTTTT	TTCTTCGAGGCAGAGGCTAGA	Medina <i>et al.</i> , 2013
<i>SIARF7</i>	GCTGACACTGAACTGATGAGGTC	GACAGGTTGAAGAGTCATCTGAGC	Medina, 2010
<i>SIARF8</i>	CCCGAGGATGTGCAGAACT	GCGGTTTAGGGATCCAACCT	Medina, 2010
<i>SITIR1</i>	GCAGCTGTAAGCTTGACCTGAG	CTTGCTGGAATTTCCCATTTG	Este trabajo
<i>SIPIN 1</i>	GGGCTTTGAAGCTGATGATG	TTGTTCCCAACAATTGACCA	Nishio <i>et al</i> 2010
<i>SIPIN2</i>	CAGTGCTGCCTGCAGTTAAA	TTCCACCAACGAACAGAACC	Nishio <i>et al</i> 2010
<i>SIPIN4</i>	ACTCCTTAGCAAACACAAATGGG	TTTAGGCTGCATTGCCACAA	Este trabajo
<i>SIDOF10</i>	TCATTTCTGCAAGACTTGTCGAC	CGTAACGCGCCTCCTTTAGT	Este trabajo
<i>SIDOF31</i>	TCCACATCAACAGTTGGTGGGA	ACCAATGAAGAAAATTGATTGAAAA	Este trabajo
<i>SIACT8</i>	CAAGTTATTACCATTGGTGCT	TGCAGCTTCATACCAATCAT	Este trabajo

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión mediante RT-qPCR.

Las mezclas de reacción para la RT-qPCR se prepararon en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems™), en un volumen final de 20 µL, con 3 µL de cDNA (500 ng/ µL), 10 µL de SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems™) y los dos oligos en una concentración final 0,3 µM cada uno. La placa se transfirió a un termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System acoplado con el programa informático específico (Applied Biosystems™), donde se llevó a cabo la amplificación siguiendo las condiciones establecidas por el fabricante. Estas condiciones consistieron en una

atemperación de 2 min a 50°C, una desnaturalización de 10 min a 95°C, y 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consistía en una desnaturalización de 15 s a 95°C y una elongación de 1 min a 60°C. Para cada cDNA se realizaron tres replicas técnicas. Los niveles relativos de expresión se calcularon usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystems™) donde: Ct=Ciclo umbral o “*Threshold Cycle*”, es el ciclo en el que empieza a detectarse la amplificación por encima del nivel basal de fluorescencia.

Para cada muestra:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen endógeno}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ muestra referencia}$$

En los análisis se usó como gen endógeno normalizador el gen ACTINA8 (*SIACT8*) (Martín-Trillo *et al.* 2011), cuya expresión es constante en todos los tejidos analizados. El cálculo comparativo CT es válido cuando las eficacias de amplificación de los genes en estudio y el gen calibrador son similares. En todos los ensayos de expresión génica las eficiencias de amplificación estaban entre 90- 100%.

11.2 Hibridación *in situ*

11.2.1 Generación de sondas marcadas con digoxigenina

Las ribosondas se sintetizaron a partir de un fragmento de cDNA de 428 pb del gen *SIDOF10* y 399 pb del gen *SIDOF31*, clonados en el vector pCR8/GW/TOPO TA (Invitrogen™, EUA). La amplificación de los fragmentos se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos M13 directo y reverso propios del vector (Ver tabla 4), posteriormente los fragmentos amplificados se purificaron a partir de un gel de agarosa 1% y se utilizaron como moldes para cada sonda. Se transcribió la sonda en “antisentido” respecto al promotor T7 del vector, y como control negativo frente a hibridaciones inespecíficas se generó una sonda en “sentido”.

En la transcripción *in vitro* se preparó una reacción de 20 µL que contenía 200 ng de molde de cDNA amplificado, 2 µL de DIG RNA Labeling Mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-11-UTP. Roche®), 2 µL de inhibidor de RNasas (Protector RNase Inhibitor, Roche®) 2 µL de T7 RNA polimerasa y 2 µL de tampón 10X (Roche®). Esta reacción se incubó durante 2 h a 37°C. Tras la incubación cada sonda se trató con 1 µL de DNasa I libre de RNasa (Roche®) durante 15 min a 37°C. Para detener la reacción se adicionaron 2 µL de EDTA 0,2M y luego se añadió 1 µL de tRNA de levadura (10 µg/ µL, Roche®). La precipitación se realizó en 10 µL de LiCl 1M y 75 µL de etanol 100% y se almacenó a -20°C toda la noche. Al día siguiente las sondas se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 15 min, se lavaron en etanol 80% y una vez secas se

resuspendieron en 10 μL de agua desionizada estéril libre de RNAsas. Para la cuantificación de la sonda se utilizó 1 μL y los 9 μL restantes se resuspendieron en 91 μL de tampón de hibridación que inmediatamente se guardó hasta su uso a -20°C .

11.2.2 Cuantificación de la sonda

La cuantificación de la sonda se realizó mediante la técnica de hibridación de ácidos nucleicos tipo “dot blot”. A partir de 1 μL de la sonda sintetizada se prepararon diluciones 1/25, 1/100 y 1/250. 1 μL de cada dilución se dispuso en una membrana de nylon (Hybond N+), que se secó y se fijó con luz ultravioleta. Como control de la cuantificación se utilizó un RNA marcado con Digoxigenina de concentración conocida (Roche®) para el cual se prepararon las mismas diluciones y se dispusieron en la misma membrana. La membrana se incubó durante 2 min en TBS 1X (TBS 10X: 1M Tris-HCL; 4 M NaCl a pH 7,5) y posteriormente se bloqueó en *Blocking Reagent* 0,5% (Roche®) en TBS 1X durante 10 min. Posteriormente, la membrana se lavó en la solución de BSA (BSA 1%; Tritón X-100 0,3%; en TBS 1X) durante 5 min y se incubó durante 20 min con el anticuerpo anti-Dioxigenin-AP, Fab fragments (Roche®) diluido en la solución de BSA a una concentración 1:3000. Las trazas de anticuerpo se lavaron con la misma solución sin anticuerpo 2 veces durante 4 min cada una. Tras el lavado se adicionó el tampón de detección (100 mM Tris; 100 mM NaCl; 50 M MgCl_2 ; pH 9,5) y se reveló en 2,5 ml de tampón de detección 1X con sustrato (3,75 μL de NBT (100 mg/ml) y 3,75 μL de BCIP (50 mg/ml) de Roche®) incubando por 12 min en oscuridad. Finalmente se enjuagó con agua destilada estéril y se dejó secar. La dilución que se usó era la que mostraba una señal similar a la penúltima gota de la línea control.

11.2.3 Prehibridación e hibridación

Las muestras se fijaron y se incluyeron en parafina como se describió en los apartados 2.1 y 2.3, respectivamente. Los cortes histológicos colocados en portaobjetos se desparafinaron con Histo-Clear®, y se hidrataron en series decrecientes de etanol (100%, 95%, 70%, 50%, 30% y agua) dos min en cada una. Posteriormente los cortes se hidrolizaron en HCl 0,2 M durante 20 min, después se hicieron 4 lavados de 5 min cada uno, uno con agua ultrapura, dos con SSC 2X (SSC 20X: 0,3 M Citrato de sodio; 3 M NaCl a pH 7,0) y otro nuevamente con agua ultrapura. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 18 min con Proteinasa K (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón: Tris 100mM; EDTA 50mM pH 8,0). Tras la incubación los cortes se lavaron por 2 min con PBS 1X (PBS 20X: 2,75 M NaCl; 50mM KCL; 200mM Na_2HPO_4 ; 35 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) y para el bloqueo de la proteinasa K se utilizó glicina 0,2% (2mg/ml de PBS 1X) por 2 min seguido de dos lavados con PBS 1X por 2 min. Para refijar el tejido se utilizó una solución de formaldehído 4% en PBS en donde los portaobjetos permanecieron 10 min. Se lavaron nuevamente con PBS y por último el tejido se deshidrató en

series crecientes de etanol de 2 min cada una (agua ultra pura, 30%, 50%, 70%, 95% y 100%) y se dejaron secar.

Para la hibridación, las sondas se diluyeron en tampón de hibridación (TH: SSC 6X; 1,5 % SDS; 50% formamida; tRNA de levadura 100 µg/ml) a razón de 4 µl sonda / 50 µl de TH. Las sondas se desnaturalizaron a 80°C durante 2 min. Luego se pusieron 50 µl de la solución de hibridación en cada portaobjeto y se colocó un cubreobjetos sobre cada uno. La hibridación se llevó a cabo durante una noche en cámara húmeda a 50°C.

11.2.4 Lavados e Inmunodetección colorimétrica

Se realizaron tres lavados en SSC 2X con 50% de formamida (v/v) a la temperatura de hibridación 50°C, el primero de 30 min y los dos siguientes de 1 h y 30 min cada uno. Tras los lavados los portaobjetos se incubaron en TBS 1X durante 5 min y posteriormente 1h en *Blocking Reagent* (Roche®) 0,5% en TBS 1X. Tras el bloqueo los portaobjetos se lavaron en la solución de BSA (BSA 1%; Tritón X-100 0,3%; en TBS 1X) durante 30 min y después se incubaron con el anticuerpo anti-Dioxigenin-AP, Fab fragments de Roche® diluido en la misma solución anterior (1:3000). Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 20 min cada uno con la solución de BSA. Tras los lavados los portaobjetos se sumergieron en el tampón de detección (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 M MgCl₂, pH 9,5) en donde se incubaron 5 min, esta solución se reemplazó por 50 ml del tampón de detección que contenía el sustrato (75 µL de NBT (100 mg/ml) y 75 µL de BCIP (50 mg/ml) de Roche®). La incubación en oscuridad duró un tiempo superior a 18 horas, hasta que se observó la señal. Finalmente la reacción se detuvo cambiando la solución de detección por agua. Las muestras se dejaron secar, se montaron con Merckglass (Merck®) y se visualizaron bajo microscopio óptico.

12 ANALISIS Southern blot

12.1 Digestión, electroforesis y transferencia del DNA a membrana

Para este análisis se digirieron 10 µg de DNA genómico con las enzimas BamHI, EcoRI y HindIII, durante 2 horas a 37°C (en un volumen total de 40 µl para cada una de ellas). Para detener la reacción se añadieron 3 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0 y posteriormente se incubó durante 5 min a 65°C. El DNA digerido se corrió en un gel de agarosa al 0,6% (p/v) en TBE 1X. La electroforesis se corrió a un voltaje de 30V durante toda la noche. Transcurrido el tiempo, el gel se lavó durante 5 min en agua, luego en HCl 0,125 M durante 15 min y nuevamente se enjuagó en agua. Posteriormente se incubó durante 30 min en el tampón de desnaturalización (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) y se enjuagó con agua; finalmente se incubó en el tampón de neutralización (1,5 M NaCl; 1

M Tris-HCl) durante 30 min y se enjuagó con agua. Todos los lavados se realizaron con agitación suave.

El DNA se transfirió del gel a una membrana de nylon (Hybond-N⁺ Amersham) por capilaridad, en presencia de SSC 20X. La transferencia se realizó durante una noche y finalmente los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana con luz ultravioleta utilizando la cámara de irradiación UVC 500 UV Crosslinker (Amersham).

12.2 Generación de la sonda marcada con digoxigenina

La síntesis de la sonda se hizo a partir de un fragmento de 583 pb del gen *nptII* (que confiere resistencia a la Kanamicina) clonado en el vector pGEM-T (Promega). La amplificación del fragmento se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos M13 directo y reverso propios del vector (Ver tabla 4), que posteriormente se purificó a partir de un gel de agarosa 1% y se utilizó como molde para la síntesis de la sonda. La generación de la sonda marcada con digoxigenina y la cuantificación se realizaron siguiendo el mismo procedimiento usado en la hibridación *in situ* (Ver apartado 11.2). Finalmente la sonda se suspendió en 50 µl tampón de hibridación para *Southern blot* (SDS 3%; Formamida 50%; SSC 5X; buffer fosfato 50mM; *Blocking Reagent* (Roche®) 0,2%).

12.3 Prehibridación, hibridación y lavados

La hibridación se llevó a cabo en un horno de hibridación “*hybridization oven/shaker RPN 2510*” (Amersham). En primer lugar la membrana se pre-hibridó durante una hora a 50°C en el tampón de hibridación y posteriormente se agregó la sonda marcada con digoxigenina (50ng/50ml). La hibridación duró toda la noche a una temperatura de 50°C. Al día siguiente se hicieron dos prelavados el primero en una solución de SSC 2X y SDS 0,1% durante 30 minutos, el segundo en SSC 0,5X y SDS 0,1%. Posteriormente la membrana se incubó durante 2 min en el tampón de lavado (ácido maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M pH:7,5; tween 20 0,3%), posteriormente se bloqueó durante 30 min con *Blocking Reagent* (Roche®) 10% disuelto en el tampón de ácido maleico (ácido maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M pH:7,5), y luego se incubó durante 30 min con el anticuerpo anti-Dioxigenin-AP, Fab fragments (Roche®) diluido en la misma solución de bloqueo a una concentración 1:20000. Las trazas de anticuerpo se lavaron con el tampón de lavado dos veces durante 15 min. Para equilibrar la membrana se incubó durante 3 min en el tampón de detección (100 mM Tris; 100 mM NaCl pH:9,5).

12.4 Revelado

Para el revelado la membrana se dispuso en una bolsa plástica de hibridación y se añadieron 20 gotas (0,5 ml) del sustrato CDP-*Star*, *ready-to-use* (Roche®), la incubación duro 5 min, transcurrido

el tiempo se expuso a un película radiográfica FUJI Medical 100NIF X-ray film (FUJIFILM) en un casete de autorradiografía. Finalmente, se reveló en una procesadora automática X-OMAT 2000 Processor (Kodak).

13 INMUNOLocalización de Auxinas

13.1 Procesamiento de las muestras

Se tomaron flores en diferentes estadios de desarrollo antes de la antesis. El tejido se prefijó con el reactivo EDAC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride. Sigma) al 3% (p/v) en PBS 1X durante una hora en hielo. Para que el reactivo penetrara mejor se hicieron 3 pulsos de vacío de 5 min cada uno. Luego se hizo la fijación con FAE (50% ETOH; 5% ácido acético glacial; 4% de formaldehido; en PBS1X) durante 16 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo se deshidrató la muestra en soluciones crecientes de etanol (v/v) disuelto en PBS 1X (desde 50% hasta 100%). Para la inclusión en parafina se utilizó Xilol (Scharlau). Las muestras se pasaron a soluciones crecientes de Xilol disuelto en etanol (Etanol : Xilol (v/v) 3:1, 1:1 y 1:3) hasta llegar a Xilol 100 %. A partir de este momento se agregaron 5-6 lentes de parafina (Paraplast® Plus, McCormick Scientific) y se dejaron a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido el tiempo se eliminó un poco de Xilol de la solución, se agregaron 5-6 lentes de parafina y se colocaron a 37°C. Este procedimiento se repitió cada media hora aproximadamente y una vez que la parafina no se diluía se fue aumentando la temperatura hasta llegar a 60°C. En este paso ya las muestras estaban embebidas en parafina al 100% y durante tres días se hicieron cambios de parafina cada 4-horas. Finalmente las muestras se colocaron en moldes de aluminio para obtener los bloques sólidos, y los cortes histológicos se obtuvieron, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.

13.2 Inmunodetección colorimétrica

Los cortes histológicos colocados en portaobjetos se desparafinaron con Xilol, luego se hidrataron en series decrecientes de etanol (100%, 90%, 50%) de 15 a 20 min cada una, y después se incubaron en PBS1X dos veces durante 5 min. Posteriormente las muestras se sumergieron en una solución de bloqueo (1,5% glicina; 0,1% tween 20; 5% BSA; en PBS 1X) durante una hora. Transcurrido el tiempo se hizo un lavado de 5 min con una solución de concentración baja de sal (0,88% NaCl; 0,1% tween 20; 0,8% BSA; en PBS 1X), y se equilibró con BSA 0.8% (en PBS 1X) por 5 min. A partir de este momento se incubó durante 5 horas con el anticuerpo primario IAA *índole-3-acetic acid* (N1)(Rabbit polyclonal/AS09 421 de Agrisera), a una dilución de 1:100 en BSA 0,8%. Luego de la hibridación con el anticuerpo primario, se realizaron dos lavados con una solución de alta concentración de sal (2,9% NaCl; 0,1% tween 20; 1% BSA; en PBS 1X), 10 min cada uno y

después se lavó con la solución de concentración baja de sal. Posteriormente se dejó en BSA 0,8% durante una noche. Al siguiente día las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario Donkey anti-rabbit IgG-AP (AS10 841 de Agrisera) a una dilución de 1:100, por tres horas. Tras la incubación se hicieron 2 lavados de 15 min con la solución de concentración baja de sal y un lavado con agua desionizada.

Tras los lavados las muestras se equilibraron en el tampón de detección (100 mM Tris; 100 mM NaCl; 50 M MgCl₂ a pH 9,5) por 5 min, esta solución se reemplazó por 50 ml del tampón de detección que contenía el sustrato (75 µL de NBT (100 mg/ml) y 75 µL de BCIP (50 mg/ml) de Roche®). La incubación en oscuridad duró un tiempo superior a 18 horas, hasta que se observó la señal. Finalmente la reacción se detuvo sumergiendo los portaobjetos en agua. Posteriormente se dejaron secar y se montaron con Merckglass (Merck®) para la visualizaron mediante microscopia óptica.

14 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD GUS

Las muestras se recolectaron en fresco y se fijaron inmediatamente en acetona 90% durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se hicieron dos o tres lavados con la solución de revelado sin el sustrato (Tabla 8), después se sumergieron en la solución de revelado con sustrato y se aplicaron 3 pulsos de vacío de 5 min cada uno, y se incubaron a 37°C durante 16 horas (aproximadamente). Finalmente el tejido se lavó con concentraciones crecientes de etanol (15, 30 y 50 %). La fijación de las muestras se realizó con FAE (50% etanol absoluto; 10% ácido acético glacial; 5% formaldehído) aplicando nuevamente tres pulsos de vacío de 5 min, y dejándolos 16 horas a 4°C. Finalmente las muestras se llevaron a etanol al 70% y se guardaron a 4°C hasta su uso. Según el caso, algunas muestras fueron incluidas en parafina (ver apartado 2,3) y a otras se les hizo un clareado con el reactivo de Hoyer (ver apartado 2.4.1).

	Concentración
Tampón fosfato sódico pH:7,0	50mM
Ferricianuro de potasio	0,5 a 1mM
Ferrocianuro de potasio	0,5 a 1mM
Tritón -X-100	0,1% v/v
EDTA	10mM
X- gLuc*	2mM

Tabla 8. Solución de revelado utilizada en la tinción GUS. El asterisco (*) señala el sustrato.

15 ENSAYO DE EXPRESIÓN TRANSITORIA EN HOJAS DE *Nicotiana benthamiana*

Para este ensayo se hicieron las construcciones *SIDOF-YFP* y *YFP-SIDOF*, utilizando los vectores pEarleyGate101 y pEarleyGate104 (ver apartado 9). Posteriormente cada construcción se introdujo en la cepa bacteriana C58 de *A. tumefaciens* por separado. Se realizó un experimento por cada construcción. En primer lugar la bacteria llevando la construcción de interés, se cultivó en medio LB suplementado con los antibióticos de selección, a 28°C durante 16 horas. Al siguiente día, se midió la Densidad Óptica (OD por sus siglas en inglés) a 600 nm, y a partir del resultado se hicieron los cálculos para obtener una OD₆₀₀ de 0,3, diluyendo con medio líquido LB. El cultivo (a la concentración adecuada) se centrifugó a 5000 r.p.m durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 2ml de la solución de infiltración (1mM MES; 0,1mM MgCl₂; Acetosiringona 200µM). La incubación se realizó a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación constante durante dos horas. Posteriormente con una jeringuilla, se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* por el envés, en total se agroinfiltraron 3 hojas por cada planta (de 3 semanas de edad). Después de dos días, se tomaron porciones circulares de hojas agroinfiltradas de aproximadamente 1 cm de diámetro, se montaron en portaobjetos con agua, y finalmente se observaron en el microscopio confocal (Ver apartado 3.3).

16 ENSAYO DE SILENCIAMIENTO MEDIADO POR VIRUS

Para el ensayo del silenciamiento mediado por virus se utilizó la técnica descrita por Liu y colaboradores (2002). Se utilizaron los plásmidos pTRV1 y pTRV2 descritos en la tabla 3. Los fragmentos de interés se insertaron en el plásmido pTRV2. Los dos plásmidos (pTRV1 y pTRV2) se introdujeron en la cepa C58 de *A. tumefaciens* cada uno por separado. Se utilizaron 5 ml de cultivo líquido con presión de selección para cada una de las construcciones, la incubación duró una noche a 28°C en agitación. Al día siguiente los cultivos se centrifugaron a 3000 r.p.m. por 20 min. Tras eliminar el sobrenadante cada sedimento se resuspendió en la solución de infiltración descrita en el apartado anterior, y se puso en agitación durante 2 horas en oscuridad. Transcurrido el tiempo se midió la OD a 600 nm, y a partir del resultado se hicieron los cálculos para obtener una OD₆₀₀ de 0,05. Para preparar la solución final de agroinfiltración se mezclaron a partes iguales la solución del plásmido pTRV1 y la solución del plásmido pTRV2 con el fragmento de interés. Finalmente, se agroinfiltraron por el envés cotiledones y hojas verdaderas de plántulas de tomate de 10 días. Los resultados del ensayo se evaluaron una vez los frutos de las dos primeras inflorescencias estaban maduros.

17 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS DE TOMATE

Para la obtención de plantas transgénicas se llevó a cabo el método de transformación genética de cotiledones descrito por Ellul y colaboradores (2003) con algunas modificaciones.

17.1 Esterilización y germinación de semillas

Aproximadamente 150 semillas (para cada transformación) se sumergieron durante 30 min en una solución de hipoclorito de sodio al 2% con 1 gota de Tween-20, e inmediatamente después se realizaron tres lavados seriados con agua destilada estéril durante 5, 10 y 15 min respectivamente. Las semillas se pusieron en una placa Petri que contenía papel de filtro humedecido con 3 ml de agua destilada estéril, en donde se incubaron durante 48 horas en oscuridad a 26 ± 2 °C. Transcurrido el tiempo las semillas germinadas se pasaron a medio de germinación (MG) y se incubaron durante 10 días en condiciones de fotoperiodo estándar, 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad a 26 ± 2 °C.

17.2 Cultivo de explantes primarios

Los explantes de partida para la transformación fueron cotiledones tomados de plántulas con 12 días de edad. A cada cotiledón se le hicieron dos cortes en sus extremos para facilitar el sitio de entrada de *Agrobacterium tumefaciens*. Los explantes se pusieron con el envés en contacto con medio de inducción de organogénesis IK 4.0/4.0 dispuesto en placas Petri, suplementado con 200 μ M acetosiringona, un compuesto fenólico que favorece la infección de la bacteria en el tejido vegetal. La incubación se realizó en oscuridad durante 24 h a 26 ± 2 °C.

17.3 Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación

La cepa utilizada para la transformación fue *A. tumefaciens* LBA4404 que contenía las construcciones de interés. El cultivo bacteriano se incubó a 28°C en oscuridad y agitación constante, en medio LB suplementado con espectinomicina (100 μ g/ μ l) como presión de selección y se hicieron subcultivos cada 48 h durante ocho días. El octavo día se transfirieron 200 μ l del cultivo bacteriano a 200 ml de medio LB suplementado con acetosiringona a una concentración de 200 μ M, manteniendo las mismas condiciones de incubación, hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,2-0,3, correspondiente a una concentración de inóculo de $10^{-2} - 10^{-3}$ UFC/ml.

17.4 Cocultivo y lavado de explantes

Transcurridas las 24 h del cultivo, los explantes se sumergieron durante 5 min en 150 ml de cultivo de *A. tumefaciens*, agitando eventualmente. Tras la inoculación, se escurrieron en un bote con malla, en la cual quedaban retenidos los explantes y se colocaron con el envés en contacto con el

medio de organogénesis IK 4.0/4.0 suplementado con 200 μ M acetosiringona. La incubación duro 48 h con las mismas condiciones descritas para el cultivo de explantes primarios. Pasado el tiempo de incubación los explantes se lavaron en medio de lavado (ML) suplementado con cefotaxima (300 mg/L) a fin de detener el crecimiento bacteriano.

17.5 Inducción de organogénesis

Tras el lavado, los explantes se secaron sobre papel de filtro estéril y se incubaron en medio organogénico IK 4.0/4.0 suplementado con cefotaxima, sin presión selectiva durante 48 horas en condiciones estándar. Transcurrido el tiempo, se pasaron a medio organogénico IKZ 4.0/4.0/1.0 con presión de selección (Kanamicina 100 μ g/mL). Este medio de cultivo permitió la formación de callos organogénicos. El subcultivo se realizó cada dos semanas alternando el antibiótico que detiene el crecimiento de la bacteria (cefotaxima y timentina). Cuando aparecían brotes individuales estos se separaban del callo organogénico y se subcultivaban en medio de elongación (MEL) hasta alcanzar un tamaño mayor o igual a 1 cm, posteriormente se transferían a medio de enraizamiento (ME).

17.6 Aclimatación de plantas en invernadero

Una vez se observaban las primeras raíces, las plantas se encontraban en condiciones adecuadas para ser transferidas al invernadero. Se eliminaron con agua los restos de agar que estaban adheridos a las raíces, después se transfirieron a macetas con fibra de coco y se cubrieron con un vaso que fue levantado paulatinamente hasta completar dos semanas.

17.7 Soluciones y medios de cultivo utilizados

17.7.1 Solución mineral MS de Murashige y Skoog (1962)

Macronutrientes	mg/L
NH ₄ NO ₃	1.650
KNO ₃	1.900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeNa.EDTA	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ .EDTA	37,3

17.7.2 Solución Vitamínica

Vitaminas	(mg/L)
Rivoflavinas	0,25
Ácido nicotínico	2,5
Tiamina-HCl	10
Piridoxina-HCl	1
Ácido fólico	0,5
Biotina	0,05
D-Pantotenato cálcico	0,5
Colina Clh	0,1
Glicina	0,5
L-Cisteína	1
Ácido málico	10
Ácido ascórbico	0,5

Nota: Las vitaminas se disolvieron en agua. Se prepararon soluciones stock concentradas 100X que fueron almacenadas a – 20°C y se añadieron al medio antes de ajustar el pH.

17.7.3 Medios de cultivo

Medio de germinación (MG)	(g/L)
Solución mineral	MS
Sacarosa (g)	10
Agar (g)	8

	(g/L)	Medio de lavado	Medios de inducción organogénica	
		(ML)	IK 4.0/4.0	IKZ 4.0/4.0/1.0
Solución mineral	MS	X	X	X
Sacarosa	30	X	X	X
Myo-inositol	0,1	X	X	X
Tiamina-HCl	0,001	X	X	X
Vitaminas SH	SH	X	X	X
IAA	0,004	X	X	X
Kinetina (K)	0,004	X	X	X
Zeatina (Z)	0,001			X
Agar (g)	8		x	X

Medio de enraizamiento (ME)	(g/L)
Solución mineral	MS
Sacarosa	20
Myo-inositol	0,1
Tiamina-HCl	0,001
IAA	0,0001
Agar	8

Notas:

- El pH del medio se ajustó a 5,7 con KOH y HCl antes de añadir el agar.
- La esterilización se llevó a cabo por calor húmedo en autoclave, a 15 libras de presión a 120°C durante 20 min.
- La zeatina se esterilizó por microfiltración y se agregó al medio inmediatamente antes de servir en placas.

17.7.4 Medios de cultivo estándar

Etapa del proceso	Medio de cultivo	Antibiótico (mg/L)		
		Kanamicina	Timentina	Cefotaxima
Precultivo	IK(4,0/4,0)	-	-	-
Cocultivo	IK (4,0/4,0) + Acetosiringona (200 µM)	-	-	-
Lavado	IK (4,0/4,0) líquido	-	-	300
Cultivo sin presión selectiva	IK (4,0/4,0)	-	-	300
Cultivo con presión selectiva	IKZ (4,0/4,0/1,0)	100	300*	300*
Elongación	Medio de elongación (MEL) IK (4,0/4,0)	100	300*	300*
Enraizamiento	ME	100	300*	300*

* La timentina y la cefotaxima se iban alternando a fin de que la bacteria no creara resistencia al antibiótico.

18 EVALUACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA

El nivel de ploidía de las plantas transgénicas de tomate se evaluó mediante citometría de flujo, según el método de (Smulders *et al.* 1994). Este método permitió cuantificar el contenido de DNA nuclear de las células de hojas jóvenes procedentes de plantas transgénicas enraizadas en medio con Kanamicina. El tejido se troceó finamente sobre una placa Petri a la que se había añadido 200 µL de tampón de extracción de núcleos (Partec). Una vez troceado, el líquido resultante se pasó a través de una malla de nylon de 50 µm y se añadieron 800 µL de una solución colorante que contenía 1 mg/L de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec), consiguiendo así la tinción fluorescente del DNA. El DNA de los núcleos aislados se midió utilizando un citómetro de flujo Partec PAS-II Ploidy Analyser. El resultado apareció representado en un gráfico que ordenó los datos según el contenido nuclear de DNA (en el eje de abscisas) y contabilizó el número de núcleos de cada tipo (en el eje de ordenadas). Previamente la calibración se hizo a partir de una planta control diploide, utilizando el pico correspondiente al contenido de DNA igual a 2n (diploide).

19 TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE ARABIDOPSIS

Para la generación de plantas transgénicas de Arabidopsis se utilizó el ecotipo silvestre Landsberg *erecta* (Ler). La transformación se realizó según el protocolo de infiltración descrito por Bechtold (1998) con algunas modificaciones.

En primer lugar, se sembraron 20 semillas de Arabidopsis en macetas de 12 cm de diámetro en condiciones de día largo. Tras 4 semanas de cultivo aproximadamente, las plantas presentaban la primera inflorescencia y ya estaban listas para ser transformadas.

Tres días antes de la infiltración, se preparó un precultivo de 10 ml de *A. tumefaciens* cepa C58 que llevaba la construcción de interés. El medio se suplementó con los antibióticos indicados y se incubó durante una noche a 28°C. Al día siguiente se preparó un cultivo de 1L de LB, suplementado con los antibióticos correspondientes, el cual se inoculó con los 10 ml del

precultivo y se incubó durante 48 horas a 28°C en agitación. Transcurrido este tiempo las células se centrifugaron a 6000 r.p.m. durante 15 min. El sedimento se resuspendió en 200 ml de medio de infiltración (2,2 g/L MS; sacarosa 5% (p/v); 0,5 g/L MES; 0,03% Silwet L-77; a pH 5,7). Las plantas se sumergieron en la suspensión de *A. tumefaciens* en medio de infiltración durante 5 min aproximadamente. Posteriormente las plantas se secaron ligeramente en un papel absorbente, y se cubrieron con bolsas de plástico. Luego se llevaron al invernadero y un día después se les retiró el plástico. Las plantas permanecieron en el invernadero hasta la recolección de las semillas. Una vez recolectadas las semillas se secaron a 37°C durante 5 días.

19.1 Selección de transformantes

Para la selección de transformantes primarios las semillas se esterilizaron en una solución con 30% lejía y 0,01% de Tritón X-100, durante 10 min. Luego se realizaron 3 lavados con agua estéril para eliminar la solución anterior. Las semillas se sembraron en el medio de germinación suplementado con Kanamicina (2,2 g/L MS; 20g/L sacarosa; 0,1g/L MES a pH:5,9; con 0,6 % agar; 100 mg/L Kanamicina; 300mg/L timentina). Las semillas se estratificaron a 4°C durante 4 días, y luego se incubaron en condiciones de fotoperiodo estándar, 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad a 26 ± 2 °C. Después de 7-10 días, las plantas resistentes a la Kanamicina eran pasadas al invernadero en las condiciones normales de cultivo, allí permanecían hasta la obtención de semillas. Cada planta era considerada una línea transgénica independiente (T1).

Para la selección de líneas con una sola inserción de T-DNA, 100 semillas provenientes de cada planta T1, se esterilizaban y se sembraban en el medio de germinación suplementado con Kanamicina. Tras 10 días se realizaba el conteo de plantas resistentes y plantas sensibles. De esta manera se identificaban las líneas que presentaban una segregación 3:1 (Resistentes:Sensibles), y por tanto una única inserción. Las plantas resistentes (T2) eran pasadas al invernadero hasta la obtención de semillas.

Para la selección de plantas transgénicas homocigotas, se tomaban 100 semillas de las plantas T2. Estas semillas nuevamente se sembraban en el medio de germinación suplementado con Kanamicina, y en esta ocasión se seleccionaban las líneas que presentaran el 100% de plantas resistentes (T3).

20 EVALUACIÓN DE CARACTERES FENOTÍPICOS DEL DESARROLLO DE PLANTAS DE TOMATE

Para la caracterización de plantas de tomate, en este trabajo se evaluaron diferentes caracteres fenotípicos, según el caso. A nivel vegetativo, se contó el número total de hojas verdaderas hasta la primera inflorescencia, de esta manera se expresaba el tiempo de floración. A nivel

reproductivo se evaluó la viabilidad del polen y distintas características del fruto, que incluyen tanto atributos físicos como atributos del fruto procesado.

20.1 Análisis de viabilidad y germinación de los granos de polen de tomate

Para evaluar la viabilidad de granos de polen en plantas transgénicas de tomate se utilizó la tinción de acetato de carmín. Para recolectar el polen primero se separaron las anteras de cada flor en anthesis y luego el polen se espolvoreó sobre un portaobjetos, en donde se tiñeron con una solución de acetato de carmín (0,5 g de carmín en ácido acético glacial 45%; posteriormente diluido 1:1 en glicerol 30%). Finalmente las muestras se observaron mediante microscopía óptica. Los granos de polen viables mostraron una coloración rosa. (Brewbaker and Kwack 1963)

Para el ensayo de germinación de los granos de polen de plantas transgénicas, el polen se espolvoreó sobre portaobjetos que tenían dispuesto en su superficie el medio de germinación solidificado (Sacarosa 0,3 M; Ca(NO₃)₂ 1,27 mM; H₃BO₃ 1,62 mM; KNO₃ 1 mM; KH₂PO₄ 0,1mM; agar 2%) descrito por Brewbaker y Kwack (1963). Los portaobjetos se incubaron en oscuridad por cuatro horas y luego se observaron al microscopio óptico. Se consideró que un grano de polen ha germinado cuando la longitud de su tubo polínico es igual o superior al diámetro del grano.

20.2 Características del fruto en plantas de tomate

A nivel de fructificación, durante el trabajo se evaluaron según el caso, distintos atributos físicos y de fruto procesado (Tabla 9). Para los análisis se tomaron frutos en estadio rojo maduro. Con el fin de determinar este estadio, los frutos se marcaban en color amarillo-naranja, y una vez alcanzaban el color rojo se recogían para el análisis (aproximadamente 7-10 días).

El peso fue evaluado mediante una balanza analítica, mientras que el resto de atributos físicos cuantitativos se evaluaron mediante un pie de rey (nonius).

CATEGORÍA	CARACTER
Atributos físicos	Peso del fruto
	Forma del fruto
	Número de lóculos
	Espesor del pericarpio
	Número de semillas
Atributos de fruto procesado	Contenido de sólidos solubles (°Brix)
	Acidez titulable
	Índice de madurez
	Índice de sabor

Tabla 9. Caracteres fenotípicos evaluados en frutos de plantas de tomate

20.3 Contenido de sólidos solubles

La determinación de los sólidos solubles (°Brix) se realizó mediante refractometría, estimando el índice de refracción (IR) con un refractómetro de mano (ATAGO N-14), el cual compara la velocidad de la luz que pasa a través de un líquido, con la velocidad a la cual pasa a través del aire. Los frutos se pelaban y se trituraban, la pulpa se filtraba a través de una gasa, para obtener el jugo. Antes de analizar el jugo, el refractómetro se calibró con agua destilada y posteriormente se dispuso una gota del jugo extraído sobre el prisma refractómetro, siguiendo las instrucciones del fabricante. El valor obtenido corresponde a los grados Brix (° Brix) y es una estimación del contenido de sólidos solubles del fruto.

20.4 Acidez titulable

Esta evaluación se realizó a través de un análisis volumétrico con una solución de NaOH 0,1 N y usando fenolftaleína como indicador. El método consistió en añadir unas 3-4 gotas de fenolftaleína a una solución de 5 mL de filtrado de tomate + 15 mL de agua destilada. A continuación se añadió progresivamente NaOH 0,1 N (utilizando bureta), hasta el momento en que la solución viró de transparente a rosa. Posteriormente, se midió el volumen final de NaOH 0,1 N utilizado y se calculó el porcentaje de ácido cítrico mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ ácido cítrico} = \frac{V1 \times N}{V2} \times K \times 100$$

En donde:

V1: volumen de NaOH (0,1 N) consumido (mL)

V2: volumen de muestra en mL (5 mL)

N: normalidad de NaOH (0,1 meq/mL)

K: peso equivalente del ácido cítrico (0,064 g/meq).

20.5 Índice de madurez e índice de sabor

Para obtener los índices de sabor y madurez nos basamos en el contenido de azúcares y ácido presentes en el jugo de tomate (Bisogni *et al.*, 1976; Navez *et al.*, 1999). El índice de madurez se obtuvo de la relación entre los sólidos solubles totales (°Brix) y la acidez titulable (AT), de esta manera el Índice de madurez es igual a:

$$\text{Índice de Madurez} = \frac{\text{°Brix}}{\text{Acidez titulable}}$$

Por otra parte el índice de sabor está dado por:

$$\text{Índice de sabor} = \frac{\text{°Brix}}{20} \times \% \text{ de ácido cítrico} + \% \text{ de ácido cítrico}$$

Los datos se recolectaron y se analizaron como se describe en el apartado 22.

21 CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS

La extracción y cuantificación de hormonas fue llevada a cabo por el servicio de cuantificación de hormonas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia – CSIC). La extracción y purificación se realizó a través de columnas de extracción en fase sólida (SPE; de fase reversa e intercambio iónico), y el análisis de cuantificación mediante UPLC-espectrometría de masas (UPLC acoplada a Q-Exactive, Orbitrap).

22 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos durante el transcurso de este trabajo se analizaron mediante el programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.15. Cuando se compararon dos muestras se realizó una prueba t de Student, considerando una $P < 0.05$, lo que equivale a un 95 % de significancia. Por otra parte, cuando se comparaban más de dos muestras, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) considerando un valor de $P < 0.05$. En este caso el método empleado para discriminar entre medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Hayter 1986).

23 MAPEO POSICIONAL DE LA MUTACIÓN HYDRA

23.1 Generación de la población recombinante

La población de mapeo se generó a partir del cruce entre la línea mutante *hyd-1* en heterocigosis y la línea silvestre de tomate *Solanum pimpinellifolium*. Tras el cruce de las líneas se obtuvo el híbrido F_1 , y la autofecundación de estas plantas dio lugar a la población segregante de la mutación (F_2). La cual ha sido utilizada para el mapeo de la mutación *HYDRA*.

23.2 Mapeo cromosómico

Para el mapeo cromosómico de la mutación se seleccionaron los marcadores moleculares InDels descritos previamente (ftp://ftp.solgenomics.net/maps_and_markers/LippmanZ/), los cuales están basados en PCR y detectan polimorfismos de acuerdo al tamaño de amplificación. En total se utilizaron los 51 marcadores desarrollados por Revital Brontein (revital.bronstein@weizmann.ac.il) (Tabla 10), que abarcan el genoma entero en intervalos de al menos 40 cM, para el mapeo entre las especies de tomate *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium*.

Nombre	Lyc vs pimp	Oligonucleótido directo 5'-3'	Oligonucleótido reverso 5'-3'
ch1_1	106-116	GGAAGACCATGTGAGTTTACA	GCTGCTGTGAAGGTCTATTCTT
ch1_13	69-83	CACGTAATCGTTGTAGAGTGTT	GTGAATGCTCGAATTCTTCTT
Y_chr1_3	116-103	CACGTTCAAATTCACGAGTT	GCAAGAAGATAGTTGGTGACTA
Y_chr1_4	107 - 96	GTTCAACATGCTAAGGTCTGAA	CCAAGGTTTCCATTTCTGGT
ch1_35	223-248	CAAGTCGTTGATGAAGGACAT	GTGTGAAGGTAGAGAGTGTT
Y_chr2_1	389-440	GGAGTTGTAGTAGGTGTTGA	GGTGGAGATTATGGAGGTTAT
Y_chr2_2	429-336	GGTCATTTCAACCATCAGTGAA	CAGTTGACAACCTACTCACGAA
Y_chr2_3	486-720	GTTCAAGTCGATTCTCCTACT	GTACTGTGAGTTACAAAGCACA
Y_chr2_4	373-311	CTGTAGGTAGGTTGAAGTCAT	CTTCTCTAATTGCAGACTTGT
Y_chr2_4.1	411-603	CGTGGTTGAAAGCTTCAAAT	GCATGTAGACTGCATGAAGTA
Y_chr2_5	134-173	CAATCTCGTTAGAATAAAGCCTT	GCCTTGCTGAAAACCTATGGTT
ch3_1	273 - 247	GGAAACATGAGGCTTGTGGA	GCTCAATAATAAAGGAGGTTCA
ch3_4	290 -268	CTGTAGGTGATAGAGTTGAT	GTGAGAGTCAATGGACTTTA
Y_chr3_3	541-486	GCGTCTCTTCATGTCTTACT	GGTAACAACCAAAACCACATCA
Y_chr3_4	348 -418	GCAGCTCTCTGATCTGGATA	GCATAACCTAATGGTCTTCTA
ch3_27	512 -636	GCCTAGTTGTGACAGTGAAGA	GCCTTTGGACAAACACTTACAA
Y_chr3_6	195 - 277	CATCAGTTGGAAGCAAACGAT	GATCTGTGTTGAGAAAGTCTT
Y_ch4_2	249 -285	CTCTATGTGAGGTTAGGAGTT	CTCTCGATAAATATGTGGTTAAC
Y_ch4_7	213 -308	GTGCCAGTACTAATGCATTCA	CAGTAATGTTTGCAGGTCCT
Y_chr4_3a	162 -178	GCAGGGAAATAACATCACTCT	GTGCTTCTATGGTCCATCAAA
Y_chr4_4c	683-753	GCCTCTTATAGGTTGTCCATT	GTATTTGCAATGTGGCAGGAA
ch5_4	180-152	GCATGTCTCAATGTCGAAACA	GAAACCCAAAATATGTGCAAA
ch5_10	382-455	CCTAGTTTGACTGAGAACAGA	GATCCGATCTCCATCATTGAA
ch5_24	415-302	GGACTTCATAGTCACGAGAAA	GTGGAGTCTTCGAGAACATTA
Y_chr5_4	202-170	GGTTGTGAGGTGTCTTATTCT	GCCACCATTGCAGTATAGATA
Y_chr6_1a	256-221	CCTGGAGTGCAAGTTCAATAA	GTAGGTCTGACCACAAATCTA
ch6_15	208 -234	CACCTCAACCTCAAAGCAAAA	GTCATCATCGAAATGGCTACT
ch6_19	177-204	GGTTGTTGCATCATGTAAGCA	CCGTGCTGAATCGTTAAGAAA
ch6_26	756 -878	CGGTATGGTCTTGTAACTGTT	CACGTTTGTGGTGGATTCTT
Y_chr7_1a	330 -469	CACTGGCAATGAAGGGAATAT	CCTTGCCTAATGTATGCTCT
ch7_15	382-428	CAGACTTACCTCTACCTTGT	CTACGAGGATGAATTCTCTGA
ch7_25	284-262	GAGCTGTTTCTCAGCTTGT	GCCTATATTACCACGAGACAA
ch8_3	270 -227	CATGTGAGACTAGTGTCTGAA	CGAGAGCAAACAGAAGAGTAA
Y_chr8_2	409-380	GGCATGATTCAGATGCTAGTA	CGCATCTGAGTCATTCACTAT
Y_chr8_3	238-307	GACATGGAAGGACTTACTGTA	CTATGTCTCATCTGAGAGCAA
ch9_2	608 -201	CTGAATCTTGTGACCTAGCT	GGCAGGTTGTCAGCATTATTT
Y_chr9_2	525 -576	GACACGTGGAGTGGAGAAAA	CCTCATTTGAATACCACGACA
Y_chr9_3	323 -287	CTGTAAGTGGATCACTCCAT	GAGACAACAGTGGGTAAGAAA
ch9_31	349 -303	GCAGGTAATCCTCCTTGTAT	CCTTTACATGTTGTAGCAGGT
ch10_6	330 -377	GCCTCGAAGGAAGTGAAGAAA	CCATTCCTTAGTGTATAGGGA
Y_chr10_2a	224-250	GTACCTTAGACTATGATCGA	CATGCTCCAACATCTTAGCTA
Y_chr10_F3a	271-242	CTTGTGCAGATTGTTCTCCTA	CCACCTAATGGATAAATGGGAT
Y_chr10_3b	622 - 418	GATTGCTTCTCGTACTAGCTT	GGATACTGGTTAGTTCTGA
ch10_27	323 -261	GAGTACCAAGACCATCAAAT	CGTATATGGACTCGGTACATT
ch11_6	236-317	CCACCTTAGTAGAGAAGTTGT	GGTTGTGGAGGACATGTATTA
Y_chr11_F2c	353-417	GAGACTGTCATCTGCATATGA	GCAAATCATGGATGCAACACT
Y_chr11_3	251 -201	CCAGTCACTTCCATACTCAA	GATCCGTCTCGATCTTATT
ch12_1	197 -224	GCATTCGAACTTCTGTGATA	CTCCAGGACCAAATTATCCAT
ch12_10	404 - 351	GATTGTCGGTGTGATGGGAT	CTGAGAGTTTGAGATAGCCAA
ch12_19	168 -590	CGGTTAAAGCCACATTTGTGT	GAGGCTCTAAAAGCATTCTCT
ch12_32	231 -265	GTCTCGACTTTCATGTCACTT	CTGAGAGGTTTACGATGTGCA

Tabla 10. Marcadores moleculares InDels utilizados para el mapeo cromosómico del locus *HYDRA*.

23.3 Detección de polimorfismos mediante el análisis de curvas de fusión de alta resolución

Este análisis también denominado HRM (por sus siglas en inglés *High Resolution Melting*), se utiliza para detectar polimorfismos en un solo nucleótido o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Se utilizaron 7 marcadores tipo HRM del cromosoma 7 de tomate. Los oligos utilizados se diseñaron a partir de las secuencias génicas disponibles en <http://solgenomics.net/>, utilizando el programa Primer Express v.2.0 (Applied Biosystems™). Cinco pares de oligos fueron diseñados en el laboratorio del Dr. Antonio Monforte, del Instituto de Biología Molecular de Plantas (SC_snp_sl_68592, SC_snp_sl_68261, SC_snp_sl_53591, SC_snp_sl_12149 y SC_snp_sl_70595; (datos por publicar). Los dos pares de oligos restantes se diseñaron durante la realización de este trabajo (Ver tabla 11). Las PCRs se llevaron a cabo en el termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System acoplado al programa informático específico (Applied Biosystems™). Las mezclas de reacción se realizaron con el reactivo MeltDoctor™ HRM Master Mix (Applied Biosystems™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente el análisis de resultados se hizo utilizando el software HRM v2.0 (Applied Biosystems™).

Marcador	Oligonucleótido Directo 5'-3'	Oligonucleótido Reverso 5'-3'
SC_snp_sl_6291	GCAATAGAGGACCCTTCAGGC	CAGCTGGCATGTTTCAGCAA
SC_snp_sl_71003	GTGTGAAGGGATACAGGTAGTTGTGT	CTTCCAATGAGCTCCAGATCACT

Tabla 11. Marcadores moleculares tipo HRM diseñados para el mapeo fino del locus *HYDRA*.

Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de las secuencias disponibles en la página <http://solgenomics.net/>.

IV. **CAPITULO I:**

CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE *hydra* DE TOMATE

RESULTADOS

1 CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES ANDROESTÉRILES Y PARTENOCÁRPICOS DE TOMATE

Con el objetivo de profundizar en la comprensión del proceso de la partenocarpia ligada a la androesterilidad, se decidió realizar una búsqueda de mutantes de tomate androestériles que desarrollaran frutos partenocárpicos. De esta manera se pretende aportar información genética al estudio de este proceso, complementando el abordaje genómico llevado a cabo previamente en la línea partenocarpica *PsEND1:barnasa* (Medina 2010).

1.1 Identificación de líneas mutantes

Para este estudio se estudiaron dos líneas mutantes androestériles que producen frutos sin semillas. La primera línea mutante llamada 366-ET-73, se ha obtenido como resultado de la colaboración con los laboratorios de los Drs. Vicente Moreno (IBMCP, Valencia) y Rafael Lozano (Universidad de Almería). Esta línea pertenece a una colección de mutantes de tomate por inserción de T-DNA generada mediante la utilización del vector binario pD991 que posee el gen *nptII* que confiere resistencia a la Kanamicina en plantas. El fondo genético utilizado para esta colección fue la variedad comercial de tomate P73. La segunda línea mutante llamada e1450m1, fue amablemente cedida por el laboratorio del doctor Dani Zamir (*The Hebrew University* de Jerusalem, Israel), en donde han generado una colección de mutantes en el fondo genético M82 mediante la utilización de Etil Metil Sulfonato (EMS), un mutágeno químico que genera transiciones de GC por AT (Menda *et al.* 2004).

Ambas líneas mutantes se obtuvieron a partir de poblaciones segregantes, ya que las plantas homocigotas al ser androestériles no se pueden autofecundar. El análisis de segregación de las plantas heterocigotas consistió en analizar el número de individuos con fenotipo mutante y silvestre para cada una de las líneas mutantes. En ambos casos la proporción de segregación del fenotipo silvestre frente al fenotipo mutante es cercana a 3:1. Para determinar si la segregación observada se ajusta a una segregación mendeliana 3:1 se realizó una prueba chi-cuadrado (χ^2), que compara los fenotipos obtenidos con los fenotipos esperados. En este análisis se aplicó un nivel de significación del 5% (0,05) (Tabla 12). Los cálculos de χ^2 para ambos casos muestran un valor menor que el $\chi^2_{teórico}$ (χ^2_t), es decir que no existen diferencias significativas entre los resultados esperados y los obtenidos y por tanto, las líneas mutantes 366-ET-73 y e1450m1 presentan una segregación mendeliana 3:1, que corresponde a una única mutación de carácter recesivo.

Parental	Fenotipo de la población segregante	Fenotipo Observado	Fenotipo esperado	Grados de libertad (Fenotipos -1)	$\chi^2_{t(1-0,05)}$	$\chi^2_{(calculado)}$
Línea heterocigota 366-ET-73	Mutante (aa)	15	20,25	1	3,84	1,81
	Silvestre (AA o Aa)	66	60,75			
Línea heterocigota e1450m1	Mutante (aa)	11	12	1	3,84	0,11
	Silvestre (AA o Aa)	37	36			

Tabla 12. Evaluación de la segregación de líneas mutantes 366-ET-73 y e1450m1 en heterocigosis.

Se muestra la comparación de los fenotipos observados y los fenotipos esperados de acuerdo a una segregación 3:1. $\chi^2_{t(1-0,05)}$, es el valor según la tabla de distribución χ^2 para un grado de libertad y un nivel de significación del 5% (0,05).

Con el fin de evaluar el número de inserciones de T-DNA presente en la línea 366-ET-73, se germinaron semillas de la población heterocigota en presencia de Kanamicina. La proporción obtenida fue 3:1 (resistente a la Kanamicina : sensible a la Kanamicina) lo cual, siendo el carácter de resistencia a la Kanamicina dominante, indica la presencia de una única inserción de T-DNA. Además se llevó a cabo una hibridación tipo *Southern* utilizando DNA genómico de plantas de fenotipo mutante y una sonda del gen *nptII* presente en el T-DNA. Los resultados muestran una única banda para las 3 enzimas utilizadas, *EcoRI*, *Bam HI* y *HindIII* (Figura 8 A), que indica la presencia de una única inserción de T-DNA. Sin embargo, posteriormente se identificaron plantas de fenotipo mutante que resultaron ser negativas al ser genotipadas mediante PCR con oligos específicos para el gen *nptII*. En un segundo *Southern* se confirmó este resultado (Figura 8 B), lo que indica que no existe ligamiento entre la presencia del T-DNA y el fenotipo mutante observado. A partir de este momento se procedió a eliminar el T-DNA del fondo genético seleccionando plantas heterocigotas que no presentaran el gen de la Kanamicina y que segregaran para el fenotipo mutante.

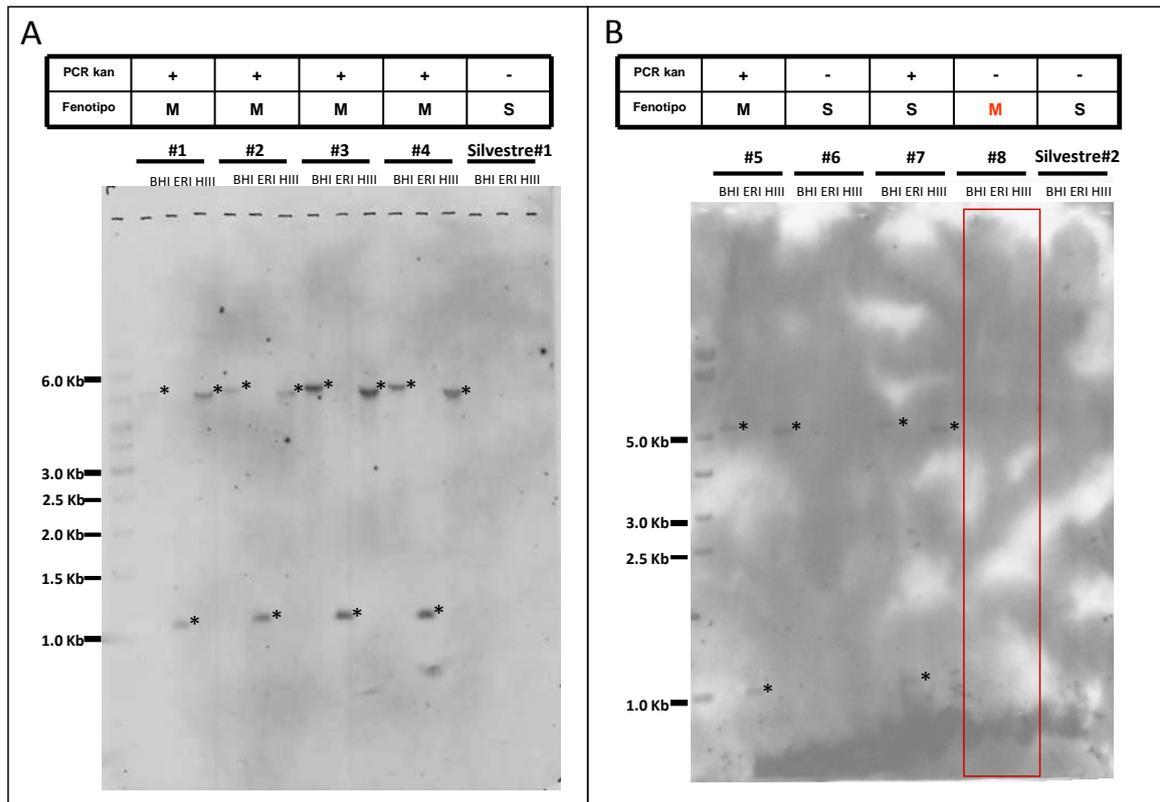


Figura 8. Análisis de ligamiento entre la inserción del T-DNA y el fenotipo mutante de la línea 366-ET-73.

En el panel superior se indica el fenotipo de las plantas analizadas y los resultados del genotipado como presencia (+) o ausencia (-) del transgen, obtenidos mediante la amplificación por PCR del gen *nptII* que confiere resistencia a la Kanamicina (kan). En el panel inferior se muestra el análisis tipo *Southern*.

A. Se analizan plantas homocigotas para el fenotipo mutante.

B. Se analizan plantas de fenotipo silvestre y mutante que proceden de una población heterocigota segregante para la mutación.

El DNA genómico se extrajo de plantas silvestres, plantas 366-ET-73 heterocigotas con fenotipo silvestre (S) y plantas homocigotas con fenotipo mutante (M). La digestión del DNA se realizó con las enzimas *BamHI*, *EcoRI* y *HindIII*. La sonda utilizada es específica del T-DNA. El asterisco (*) señala las bandas que indican presencia del T-DNA. El recuadro rojo indica la presencia de una planta mutante que no presenta inserción del T-DNA.

1.2 Análisis de complementación

Ambas líneas mutantes 366-ET-73 y e1450m1 presentan una única mutación de carácter recesivo y muestran fenotipos muy similares, lo cual sugiere que podría tratarse de mutaciones alélicas en el mismo gen. A fin de evaluar si el fenotipo de los mutantes está asociado a mutaciones en un mismo locus génico se realizó un análisis de complementación. Este análisis consistió en el cruce de ambas líneas en heterocigosis (debido a que ambos mutantes son estériles) y al análisis de la siguiente generación. Se realizaron un total de 6 cruces tomando siempre como parentales plantas con fenotipo silvestre de poblaciones segregantes de cada línea mutante. Posteriormente se sembraron y analizaron 10 plantas por cada uno de los cruces realizados.

En este experimento existían tres resultados posibles. Primero, que hubiese complementación entre las dos mutaciones y por tanto se encontrarán en diferente locus génico, con lo cual el fenotipo de todas las plantas en la población F1 deberían ser silvestres (Figura 9 A). Segundo, que no hubiese complementación génica entre las dos mutaciones ya que se localizan en el mismo locus. En este caso la población F1 debería segregar para el fenotipo mutante en una proporción 3:1 (Figura 9 B). Tercero, que independiente de que las mutaciones sean o no alélicas, alguno de los parentales del cruce tuviera genotipo silvestre, con lo cual todas las plantas de la población F1 muestran fenotipo silvestre (Figura 9 C).

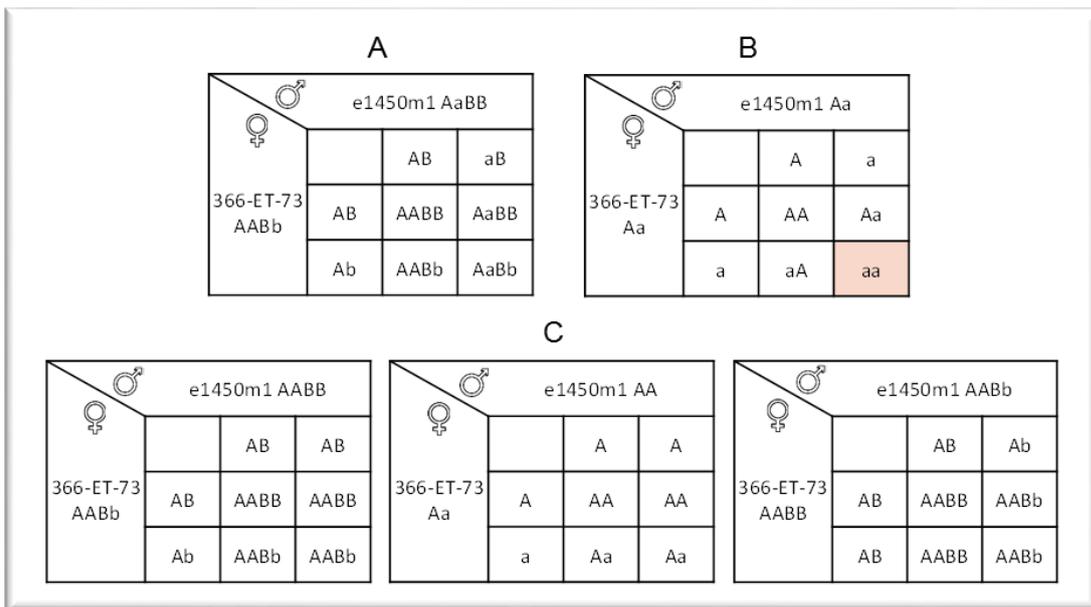


Figura 9. Representación de los posibles resultados de la población F1, producto del cruce entre las dos líneas mutantes en heterocigosis.

A. Complementación génica entre ambas mutaciones.

B. No hay complementación génica.

C. Complementación génica ya que uno de los parentales es silvestre.

Las letras mayúsculas representan diferentes genes (A y B). Las letras minúsculas representan los alelos mutados de los genes (a y b).

Los resultados muestran que en tres de los cruces todos los individuos de la población F1 presentan fenotipo silvestre. Según el párrafo anterior esto correspondería a la primera o la tercera opción (Figura 9, A y C). Sin embargo, se descartó que las mutaciones se encontrarán en un locus diferente, ya que en los tres cruces restantes se observó segregación para el fenotipo mutante. En este caso la segregación observada de los tres cruces se ajusta a 3:1 para un nivel de significación del 5% (0.05) (Tabla 13).

Parental	Cruce	Fenotipo	Fenotipo Observado	Fenotipo esperado	Grados de libertad (Fenotipos -1)	$\chi^2_{(1-0,05)}$	$\chi^2_{(calculado)}$
Línea heterocigota 366-ET-73 X Línea heterocigota e1450m1	1	Silvestre (AA o Aa)	7	9	1	3,84	1,78
		Mutante (aa)	5	3			
	2	Silvestre (AA o Aa)	5	7,5	1	3,84	2,78
		Mutante (aa)	5	2,5			
	3	Silvestre (AA o Aa)	6	8,25	1	3,84	3,78
		Mutante (aa)	5	2,75			

Tabla 13. Evaluación de la población F1, producto del cruce entre las dos líneas mutantes en heterocigosis.

Se muestra la comparación entre fenotipos observados y los fenotipos esperados de acuerdo a una segregación 3:1. $\chi^2_{(1-0,05)}$, es el valor según la tabla de distribución χ^2 para un grado de libertad y un nivel de significación del 5% (0,05).

Los resultados indican que no existe complementación génica en el cruce de las líneas mutantes y por tanto las mutaciones son alélicas, es decir que se encuentran en el mismo locus génico (Figura 9 B). A partir de este momento se decide nombrar este locus como *HYDRA* y las líneas mutantes conocidas como 366-ET-73 y e1450m1 se denominaron *hyd-1* e *hyd-2*, respectivamente.

1.3 Caracterización fenotípica del mutante *hydra*

1.3.1 Estructura y desarrollo de la planta

Las dos variedades de tomate utilizadas en este estudio presentan un sistema de ramificación y un tipo de crecimiento diferente. La variedad P73 se caracteriza por tener un desarrollo indeterminado, es decir, la yema siguiente a la inflorescencia terminal continúa creciendo, y esta secuencia de crecimiento se repite indefinidamente. Por su parte, la variedad M82 presenta un desarrollo determinado, en este tipo de crecimiento se produce una fuerte brotación de yemas axilares y cada una presenta una inflorescencia terminal, dando lugar a una apariencia arbustiva. Al observar las líneas mutantes *hyd-1* e *hyd-2* se evidencia que ambas líneas presentan un desarrollo vegetativo indistinguible de los fondos genéticos silvestres utilizados para su obtención, las variedades comerciales P73 y M82 respectivamente. No hemos detectado por tanto, alteración fenotípica del desarrollo vegetativo en plantas de ambos genotipos mutantes.

1.3.2 Desarrollo reproductivo

Las flores de las plantas mutantes muestran un fenotipo característico que consiste en el desarrollo anormal de los estambres, los cuales presentan un aspecto filamentososo. Adicionalmente, el fruto inicia su desarrollo sin necesidad de que ocurra fecundación, generando así frutos partenocárpicos.

1.3.3 Caracterización del desarrollo floral

1.3.3.1 Número de órganos florales

Con el fin de detectar si existían cambios en el número de órganos florales en las plantas *hydra*, se realizó un muestreo de flores en anthesis tanto de plantas silvestres como de las plantas mutantes. Se recogieron 10 flores para cada línea mutante, a cada flor se le realizó una disección separando los cuatro verticilos y se procedió a contar el número de órganos presentes por cada verticilo.

Los resultados muestran que las flores de tomate provenientes de plantas silvestres de las variedades P73 y M82, presentan la fórmula floral 6:6:6:4 y 6:6:6:2, respectivamente (Figura 10 y 11, A, B, E y F). En las flores provenientes de plantas *hydra* la fórmula floral es la misma que en las plantas silvestres (Figura 10 y 11, C, D, G y H), lo cual quiere decir que no existen diferencias en el número de órganos florales entre las variedades silvestres y las líneas mutantes, indicando que la mutación *hydra* no altera el número de órganos florales.

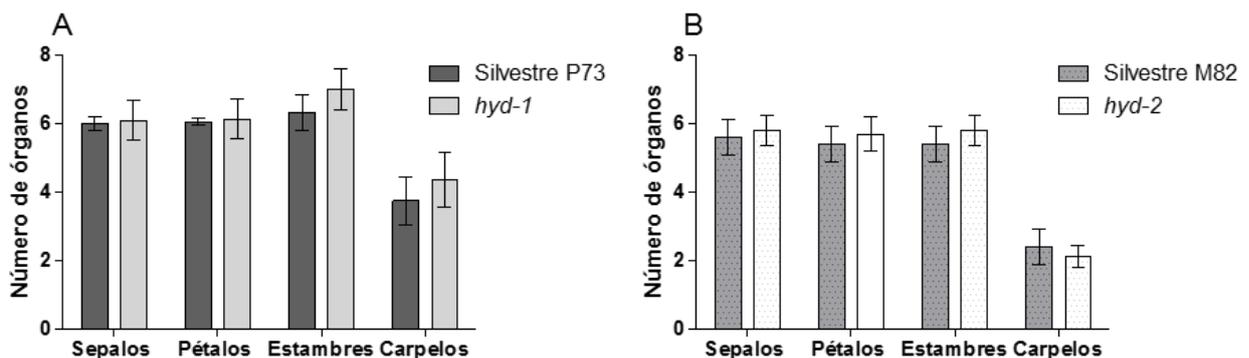


Figura 10. Comparación del número promedio de órganos florales entre plantas silvestres y plantas con fenotipo mutante *hydra*.

A. Corresponde a la comparación entre el silvestre *S. lycopersicum* var. P73 y el mutante *hyd-1*.

B. Corresponde a la comparación entre el silvestre *S. lycopersicum* var. M82 y el mutante *hyd-2*.

Los datos representan la media, las barras indican el error estándar de los datos.

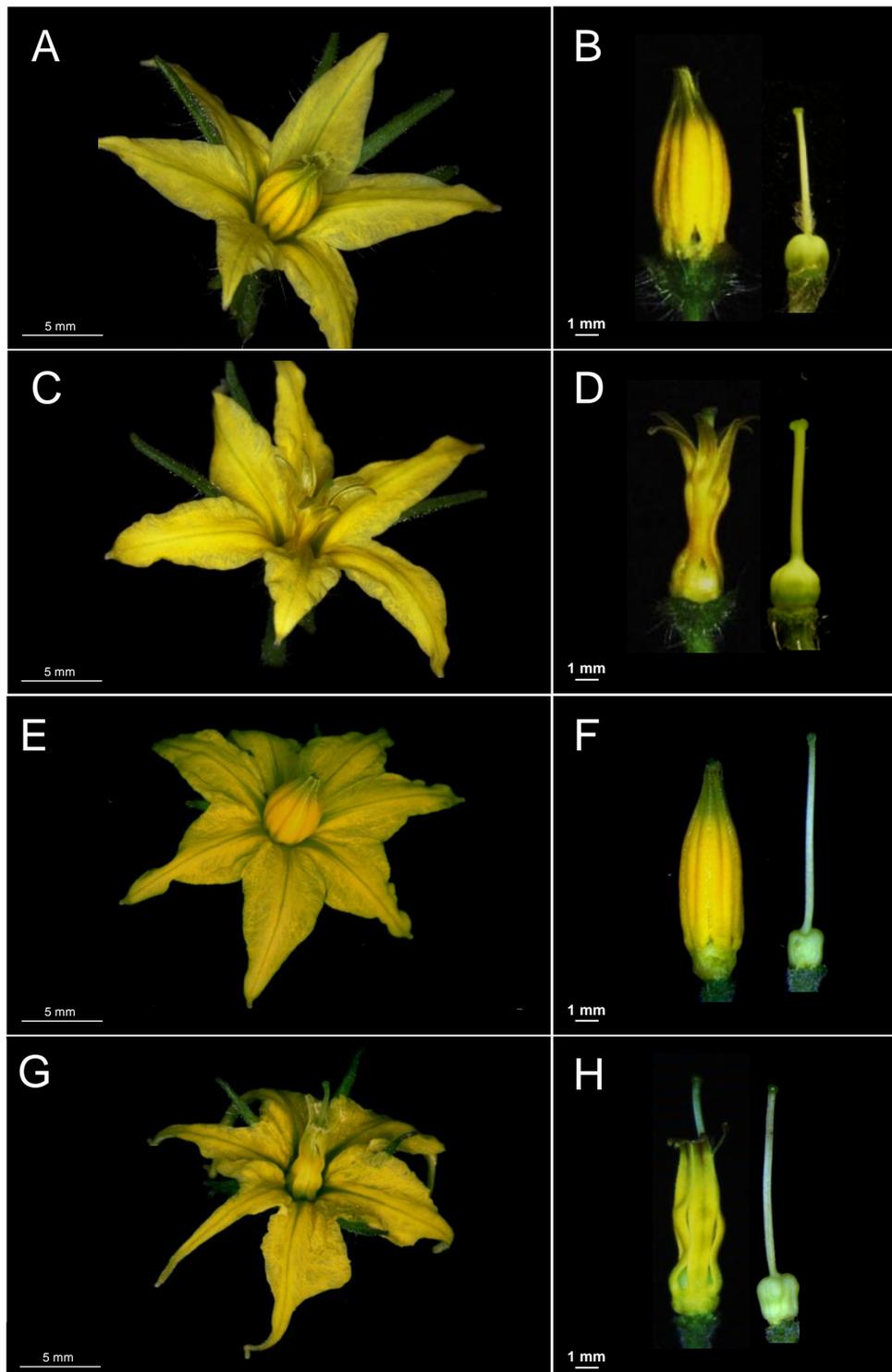


Figura 11. Fenotipo floral de las plantas mutantes *hydra*.

- A. Flor de planta silvestre *Solanum lycopersicum* var. P73.
 B. Detalle de estambres y ovario flor silvestre.
 C. Flor de planta con fenotipo mutante *hydra* en fondo P73 (*hyd-1*).
 D. Detalle de estambres y ovario *hyd-1*.
 E. Flor de planta silvestre *Solanum lycopersicum* var. M82.
 F. Detalle de estambres y ovario flor silvestre Var. M82.
 G. Flor de planta con fenotipo mutante *hydra* en fondo M82 (*hyd-2*).
 H. Detalle de estambres y ovario *hyd-2*.

1.3.3.2 Análisis morfológico del desarrollo de los estambres en plantas mutantes *hydra*

Las flores de tomate en plantas silvestres presentan 6 estambres que poseen filamentos cortos fusionados entre sí y unidos a la base de la corola. Estos filamentos sostienen las anteras que se encuentran unidas lateralmente por dos filas de estructuras filamentosas para formar el cono estaminal que envuelve el pistilo. Cuando ocurre la dehiscencia de las anteras se liberan los granos de polen maduros, los cuales caen sobre el estigma de la flor, posibilitando que se dé la autopolinización (Figura 11 A, B, E y F). En las flores de las plantas mutantes *hydra* la morfología de los estambres es diferente. Los estambres son planos, de aspecto filamentosos y no están unidos longitudinalmente, excepto en la base. Esta disposición no permite una apropiada formación del cono estaminal y en consecuencia el pistilo queda descubierto (Figura 11 C, D, G y H).

Existen algunas plantas androestériles en donde la partenocarpia está relacionada con cambios homeóticos. A fin de evaluar si existe algún cambio de identidad en los estambres de plantas *hydra*, se realizó un análisis por microscopía electrónica de barrido. Para ello se hizo una disección de flores en antesis de plantas silvestres de tomate (var. P73 y M82) y plantas mutantes *hyd-1* e *hyd-2*. Los estambres en las plantas silvestres están formados por anteras con dos sacos polínicos engrosados, en donde se encuentra almacenado el polen (Figura 12 A, C y E). En la cara interna de los estambres se pueden ver las líneas de pelos formando el canal común que retiene los granos de polen antes de la dispersión (Figura 12 C). Por su parte, los estambres de las plantas mutantes presentan una estructura plana, como se había visto anteriormente (Figura 12 B y F). Dentro de la cara interna de los estambres del mutante *hyd-1* se observan dos hundimientos que corresponderían a los sacos polínicos aunque no se observa formación de polen (Figura 12 D).

Los análisis mediante microscopía electrónica de barrido no evidencian transformaciones homeóticas de los estambres de plantas mutantes. A pesar del cambio morfológico respecto al silvestre, se observa la distribución típica del estambre en filamento y antera. Por otra parte no se observa la formación de polen lo que indicaría que los estambres de los mutantes *hydra* no son funcionales.

En el análisis por microscopía electrónica no se observa formación de polen en las plantas *hydra*, sin embargo, no podemos saber si la producción del polen se ha detenido en algún momento de su desarrollo o si ni siquiera se ha iniciado. Por esta razón se decidió analizar el desarrollo del estambre mediante microscopía óptica utilizando cortes transversales. Se analizaron dos estadios de la flor: 12 y 8 días antes de la antesis.

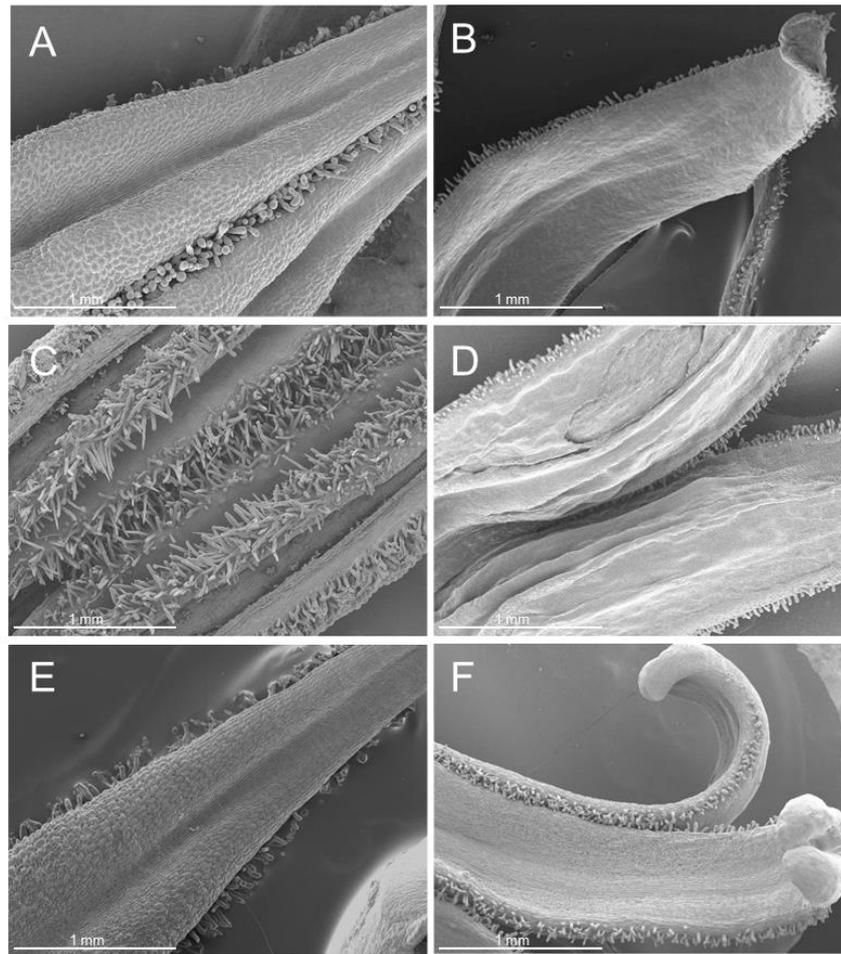


Figura 12. Morfología de los estambres de plantas *hydra*, observados mediante microscopía electrónica de barrido.

- A. Estambre de flor silvestre *S. lycopersicum* var. P73
- B. Estambre de flor con fenotipo mutante *hyd-1*.
- C. Superficie interior del estambre de flor silvestre *S. lycopersicum* var. P73.
- D. Cavidad interior del estambre de flor *hyd-1*.
- E. Estambre de flor silvestre *S. lycopersicum* var. M82.
- F. Estambre de flor con fenotipo mutante *hyd-2*

En el primer estadio evaluado, los estambres de plantas silvestres se observan engrosados y con la presencia de sacos polínicos en etapas iniciales de desarrollo (Figura 13 A y C). Por el contrario, en los las flores de plantas mutantes 12 DAA, los estambres se observan delgados y sin la presencia de los sacos polínicos (Figura 13 B y D). En la siguiente etapa evaluada (8 DAA), las flores de plantas silvestres presentan estambres donde se puede observar la presencia del tejido esporogénico dentro de los sacos polínicos (Figura 13 E, G, I e K). En flores *hydra* no existe formación del tejido esporogénico (Figura 13 F, H, J y L) y por el contrario los estambres son macizos (Figura 13 J y L), indicando que desde las primeros estadios los mutantes ya presentan un desarrollo anómalo.

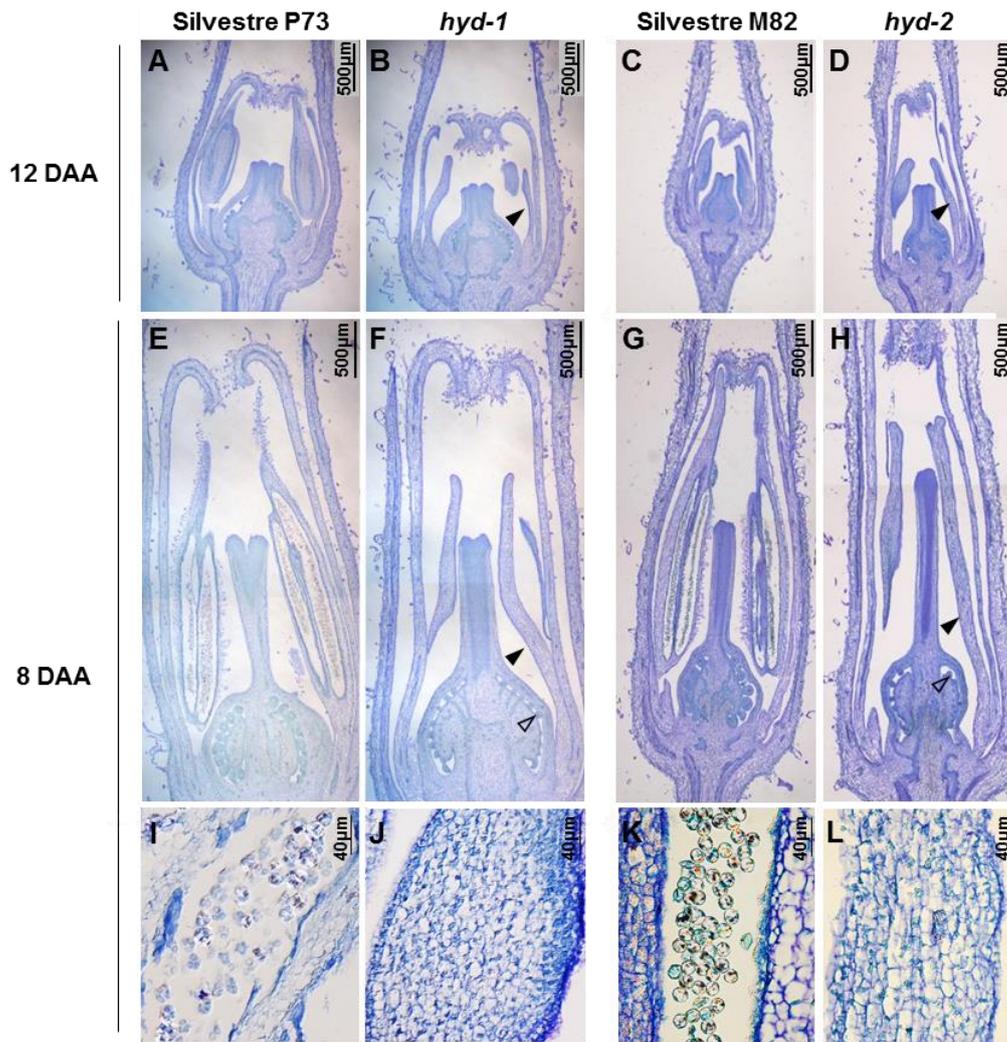


Figura 13. Desarrollo floral del mutante *hydra* en estadios tempranos.

Se muestran cortes transversales de flores de 12 y 8 días antes de la antesis (DAA) teñidos con azul de toluidina.

A y E. Flores silvestres *S. lycopersicum* var. P73.

B y F. Flores de plantas mutantes *hyd-1*.

C y G. Flores silvestres *S. lycopersicum* var. M82.

D y H. Flores de plantas mutantes *hyd-2*.

I y K. Detalle de la estructura de los sacos polínicos en estambres 8 DAA de plantas silvestres *S. lycopersicum* P73 y M82, respectivamente.

J y L. Detalle de estambres de flores mutantes *hydra* (*hyd-1* e *hyd-2*, respectivamente) 8DAA.

Las flechas negras y blancas señalan respectivamente los estambres y los óvulos afectados del fenotipo mutante desde las etapas tempranas del desarrollo de la flor.

1.3.3.3 Análisis morfológico del desarrollo del ovario en plantas mutantes *hydra*

En lo que respecta al ovario de las líneas mutantes *hydra*, visualmente no se evidencian diferencias morfológicas, salvo que en antesis el tamaño es levemente mayor que el de una flor silvestre (Figura 11 B, D, F y H). Con el fin de evaluar la funcionalidad de los óvulos en plantas mutantes *hydra*, se realizó una polinización a mano con polen proveniente de plantas silvestres sobre plantas homocigotas *hyd-1*. Los frutos obtenidos a partir de los cruzamientos no contenían semillas, lo que indica que el ovario de plantas *hydra* presentaba algún tipo de anomalía.

Para evaluar si existe alguna alteración en el desarrollo del ovario, se realizó un estudio por microscopía electrónica de barrido. Para ello se hizo una fina disección de ovarios de flores en anthesis de plantas silvestres y líneas mutantes, separando cuidadosamente el pericarpio y dejando los óvulos expuestos. En ovarios de tipo silvestre los óvulos tienen forma esférica y se encuentran ocupando toda la cavidad interior del ovario (Figura 14 A y C). En los mutantes los óvulos son de menor tamaño y presentan forma de gancho (Figura 14 B y D).

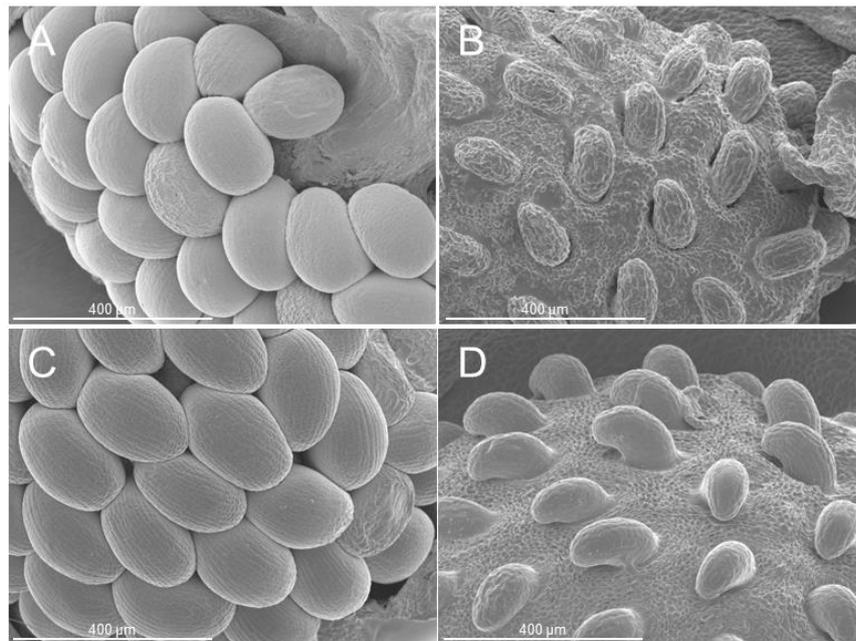


Figura 14. Fenotipo de óvulos de plantas mutantes *hyd-1* e *hyd-2* y sus respectivos fondos silvestres, observados mediante microscopía electrónica de barrido.

- A. Óvulos de plantas silvestres var. P73.
- B. Óvulos de plantas con fenotipo mutante *hyd-1*.
- C. Óvulos de flor silvestre var. M82.
- D. Óvulos de planta con fenotipo mutante *hyd-2*.

Al mismo tiempo, se analizaron los cortes transversales de flores en estadios tempranos de desarrollo descritos en el apartado anterior. En el primer estadio evaluado, 12 días antes de la anthesis, el desarrollo de los óvulos de plantas mutantes es indistinguible del silvestre (Figura 13 A y D). Sin embargo, en el siguiente estadio evaluado (8 DAA), los óvulos no alcanzan el mismo tamaño que los óvulos de plantas silvestres (Figura 13 E - H).

Con el objetivo de evaluar el desarrollo del saco embrionario de los óvulos se tomaron ovarios de 10 y 2 DAA y en anthesis de plantas *hyd-1* y silvestres. Tras un clareado los óvulos se analizaron mediante microscopía confocal. En el análisis se pudo observar que en los óvulos de plantas silvestres existe una cavidad interior correspondiente al saco embrionario, el cual a los 10 DAA es inmaduro y las células internas se encuentran en etapa de diferenciación celular (Figura 15 A). En la anthesis el saco embrionario ha madurado completamente, las células están diferenciadas en las 7 células características, una célula central, la ovocélula, dos sinérgidas y 3 antípodas (estas

últimas generalmente no se observan ya que sufren un proceso de muerte celular programada). En la Figura 15 C, se pueden observar el saco embrionario de óvulos de plantas silvestres con cuatro de las células mencionadas. Cuando analizamos el desarrollo del óvulo en plantas *hyd-1* 10 DAA vemos que no se observa la presencia del saco embrionario, en cambio se ve un tejido uniforme (Figura 15 B). Los óvulos de flores mutantes en antesis muestran grupos de células de menor tamaño en la zona central, que podría corresponder a células en división en el interior del óvulo (Figura 15 D). Sin embargo, los óvulos de plantas *hyd-1* en los estadios evaluados no muestran desarrollo de integumentos (Figura 15 B y D). Nuestras observaciones indican que la mutación *hydra* está afectando tanto a la esporogénesis como a la gametogénesis femenina y en consecuencia no se produce un gametofito funcional.

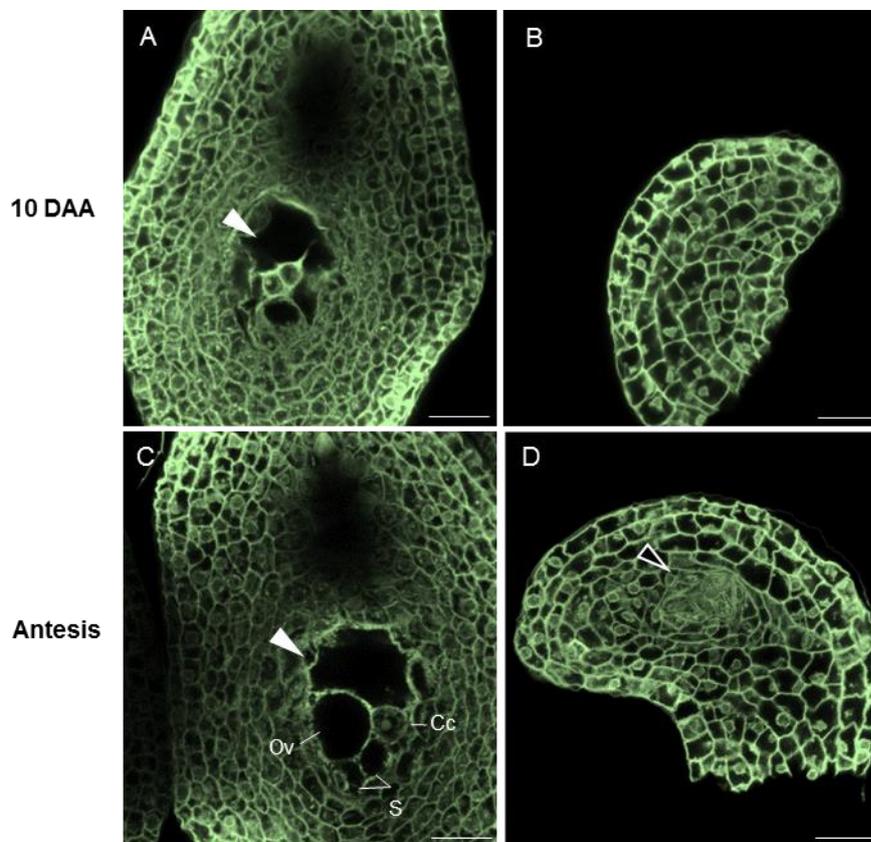


Figura 15. Observación del saco embrionario de óvulos *hyd-1* y silvestres.

A. Óvulo de flor silvestre 10 DAA

B. Óvulo de flor *hyd-1* 10 DAA.

C. Óvulo de flor silvestre en antesis. Ov, Ovocélula; S, Sinérgidas; Cc, Célula central.

D. Óvulo de flor *hyd-1* en antesis.

Las flechas blancas señalan la cavidad interior de los óvulos silvestres corresponde al saco embrionario, la flecha vacía señala la acumulación de células en división. Las barras blancas indican 20µm.

1.3.4 Caracterización del fruto

El cuajado del fruto en plantas con fenotipo mutante *hydra* sucede sin necesidad de que ocurra la fecundación, generando así frutos sin semillas, es decir frutos partenocárpicos. Estos frutos tienen

un tamaño reducido en comparación con los frutos de plantas silvestres, especialmente en las plantas mutantes del alelo *hyd-2* (Figura 16).

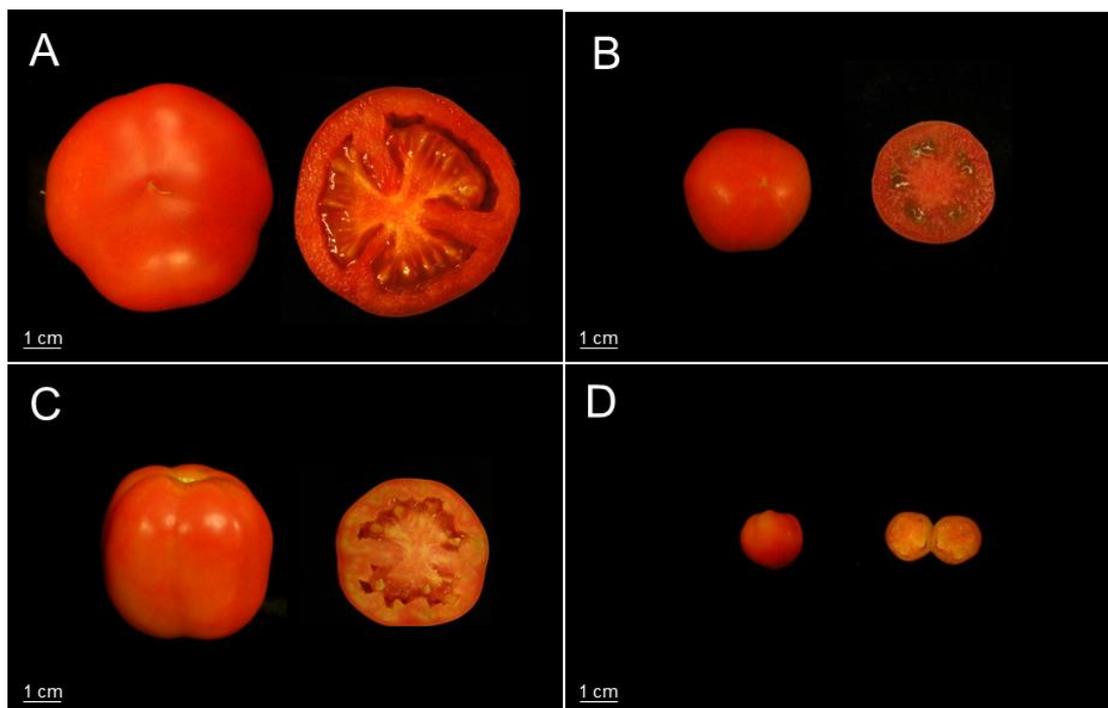


Figura 16. Fenotipo de frutos de plantas mutantes hydra.

- A. Fruto de planta silvestre *Solanum lycopersicum* var. P73.
 B. Fruto partenocarpico de planta mutante *hydra* en fondo P73 (*hyd-1*).
 C. Fruto de planta silvestre *Solanum lycopersicum* var. M82.
 D. Fruto partenocarpico de planta mutante *hydra* en fondo M82 (*hyd-2*).

1.3.4.1 Características de calidad

A fin de evaluar posibles efectos de la mutación *hydra* sobre la calidad del fruto, se analizaron diferentes parámetros físicos tales como: peso, altura, diámetro, espesor del pericarpio y número de lóculos. En cuanto a los parámetros de fruto procesado se analizaron la acidez y los grados brix (° Brix) y a partir de estos dos parámetros se obtuvieron el índice de madurez y el índice de sabor. La determinación de la acidez se realizó mediante valoración ácido-básica. Los resultados se expresan como porcentaje de ácido cítrico, por ser éste el ácido titulable mayoritario en la muestra. Los °Brix, se obtienen mediante técnicas refractométricas (MAPA 1993) y expresan la cantidad de sólidos solubles, los cuales son un indicador del contenido de azúcares presentes en el fruto. Todos los análisis se realizaron sobre frutos en estadio rojo maduro.

Respecto al peso de los frutos, para la variedad silvestre P73 el valor promedio fue de 75,8 g y para la variedad M82 es de 13,8 g (Figura 17). En plantas mutantes *hydra* se observa una disminución en el peso del fruto respecto al genotipo silvestre correspondiente. En la línea *hyd-1* la reducción es del 80 % (Figura 17 A), mientras que en la línea *hyd-2* esta reducción alcanza el

95% (Figura 17 B). Debido al tamaño pequeño de los frutos de plantas *hyd-2* los parámetros de calidad se evaluaron utilizando frutos maduros de plantas mutantes *hyd-1*.

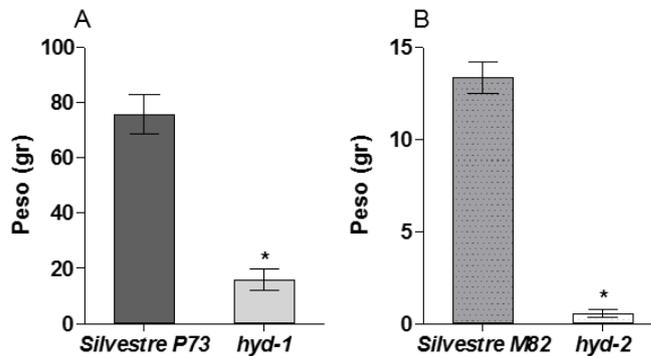


Figura 17. Peso de frutos de plantas *hydra*.

A. Comparación entre el silvestre *S. lycopersicum* var. P73 y el mutante *hyd-1*.

B. Comparación entre el silvestre *S. lycopersicum* var M82 y el mutante *hyd-2*.

Los datos representan la media \pm el error estándar de los datos para cada muestra. El asterisco indica las diferencias significativas entre las medias para $p < 0,05$ de los mutantes *hyd-1* e *hyd-2* en comparación con sus respectivos silvestres.

Al mismo tiempo se realizó la medición de la altura y el diámetro de los frutos donde se observó nuevamente una reducción en el tamaño de los frutos *hyd-1* alcanzando valores en torno a un 40% por debajo de los valores normales (Figura 18 A y B). En cuanto a la forma del fruto, esta se determinó dividiendo la altura por el diámetro. De este modo, el valor de 1 corresponde a un fruto redondo, valores inferiores a 1 indican que el fruto es achatado y valores superiores que el fruto alargado. Los frutos de plantas silvestres P73 y de plantas mutantes *hyd-1* muestran valores similares e inferiores a 1, lo que indica que los frutos son ligeramente achatados y que no hay diferencias entre ellos. Por tanto, la mutación *hydra* no modifica la forma del fruto (Figura 18 C).

También se evaluó el espesor del pericarpio, que en plantas silvestres se encuentra alrededor de 0,6 cm (Figura 18 D). Al igual que para los anteriores parámetros físicos, el grosor del pericarpio disminuye en frutos *hyd-1*, siendo un 30% menor que en los frutos silvestres.

En relación al número de lóculos del fruto, normalmente oscila entre 4 y 5 lóculos en frutos de plantas silvestres. Al evaluar este parámetro en frutos de plantas *hyd-1* se observa que no existen cambios significativos en el número de lóculos respecto al silvestre (Figura 18 E).

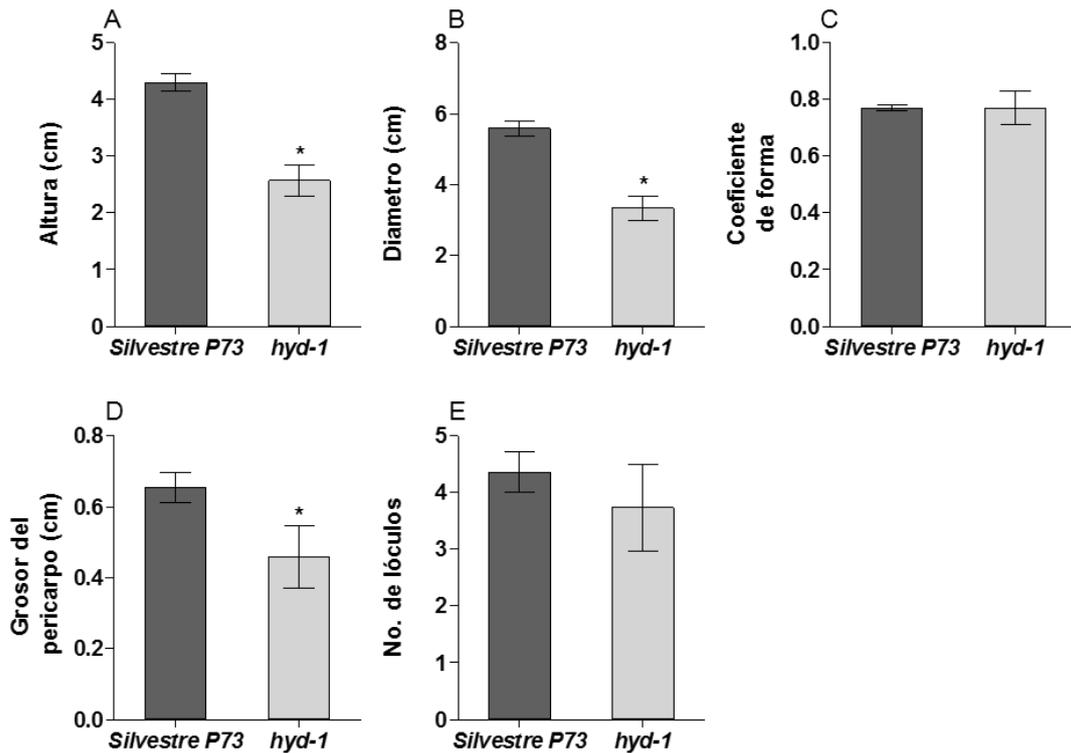


Figura 18. Características físicas de calidad de frutos de plantas *hyd-1*.

Se muestra la comparación de los frutos *hyd-1* y frutos de la variedad silvestre P73.

- A. Altura.
- B. Diámetro.
- C. Coeficiente de la forma (altura/diámetro).
- D. Grosor del pericarpio.
- E. Número de lóculos.

Los datos representan la media \pm el error estándar de los datos para cada muestra. El asterisco indica las diferencias significativas entre las medias para $p < 0,05$ del mutante *hyd-1* en comparación con los frutos silvestres P73.

Respecto a los parámetros químicos de calidad, se encontró que los frutos de plantas *hyd-1* contenían un porcentaje de ácido cítrico mayor que el de frutos silvestres. De esta manera, mientras que el silvestre muestra un porcentaje promedio de **acidez** de 0,36%, en los frutos de plantas mutantes este valor es de 0,53% (Figura 19 A).

Así mismo la evaluación de **°Brix** en los frutos *hyd-1* evidenció un incremento significativo en el contenido de sólidos solubles respecto a los frutos de plantas silvestres. Los frutos *hyd-1* presentan en promedio de 5,22 °Brix, mientras que en plantas silvestres este valor es de 4,24 °Brix (Figura 19 B).

En relación al **índice de madurez**, este parámetro se obtuvo a partir del ratio entre los °Brix y el porcentaje de ácido cítrico presentes en el fruto. El valor promedio en el índice de madurez es de 9,9 para los frutos de plantas *hyd-1* y 10,7 para los frutos de plantas silvestres, los valores indican que no existe variación en el índice de madurez entre los frutos del mutante y los frutos del silvestre (Figura 19 C).

Al mismo tiempo se realizó el cálculo del **índice de sabor**. En plantas silvestres el índice de sabor es de 0,5, mientras que en las plantas mutantes los frutos presentan un valor de 0,7. Los resultados indican que los frutos de plantas mutantes presentan un aumento significativo en el índice de sabor respecto a los valores obtenidos para los frutos de plantas silvestres (Figura 19 D).

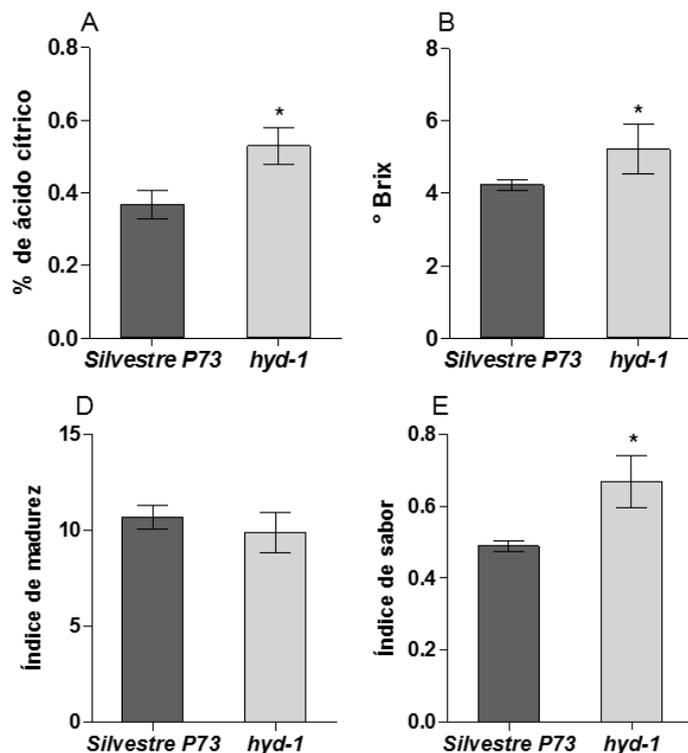


Figura 19. Evaluación de las características de fruto procesado en plantas hyd-1.

A. Comparación del porcentaje de acidez entre frutos *hyd-1* y frutos silvestres.

B. Comparación de °Brix presentes en los frutos *hyd-1* y silvestres.

Los datos representan la media \pm el error estándar de los datos para cada muestra. El asterisco indica las diferencias significativas entre las medias para $p < 0,05$ del mutante *hyd-1* en comparación con los frutos silvestres P73.

2 BASES MOLECULARES DEL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE PLANTAS *hydra*

2.1 Control hormonal

Datos experimentales indican que las auxinas y las giberelinas desempeñan un papel importante en el proceso de cuajado y desarrollo del fruto (Mapelli *et al.* 1978; Fos *et al.* 2000; Fos *et al.* 2001). La aplicación exógena de GAs o auxinas antes de la polinización puede inducir el desarrollo autónomo del ovario en tomate generando frutos partenocárpicos (Bünger-Kibler and Bangerth 1982; Alabadi *et al.* 1996). En algunos estudios se ha demostrado que el incremento de los niveles de GAs en el ovario se asocia con el desarrollo de frutos partenocárpicos, como es el caso de las plantas *PsEND1:barnasa* y los mutantes *pat* (Olimpieri *et al.* 2007; Medina *et al.* 2013). Por todo lo

anterior, en este estudio nos planteamos analizar el papel de las GAs y las auxinas en el desarrollo reproductivo del mutante partenocárpico *hyd-1*.

2.1.1 Tratamiento con paclobutrazol

Con el fin de evaluar si las giberelinas participan en la generación de frutos partenocárpicos en las plantas *hydra*, se realizaron tratamientos de plantas con paclobutrazol (PAC), un inhibidor de la síntesis de GAs. La aplicación de PAC disuelto en solución nutritiva se realizó cada tercer día sobre las raíces de plantas *hyd-1* y de plantas silvestres, el tratamiento se inició cuando las plantas presentaban la primera inflorescencia y las aplicaciones se realizaron hasta que las flores de esta inflorescencia alcanzaban la antesis. El tratamiento con PAC bloquea la síntesis de GAs impidiendo el desarrollo del ovario polinizado en plantas silvestres (Figura 20 A y B). En plantas *hyd-1*, los ovarios de plantas tratadas con PAC no detienen totalmente su crecimiento, aunque no alcanzan su tamaño normal (Figura 20 C y D). Por tanto, el tratamiento con el inhibidor de síntesis de GAs no bloquea el desarrollo del fruto en plantas *hyd-1*, sugiriendo que el desarrollo autónomo del ovario en plantas partenocárpicas *hyd-1* no depende de la síntesis de giberelinas, aunque estas contribuyen al crecimiento del fruto.

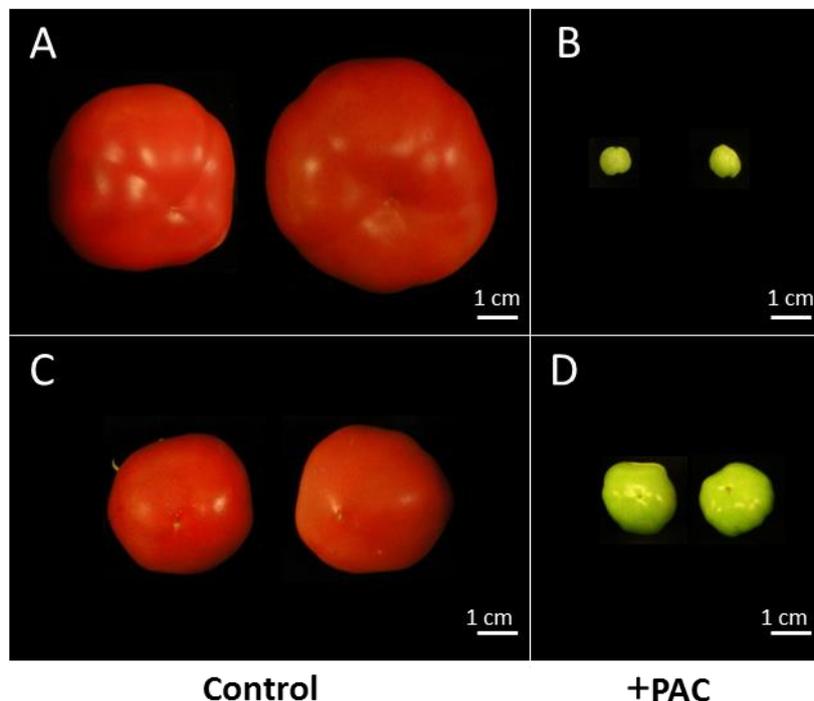


Figura 20. Efecto del paclobutrazol en la fructificación de plantas muntantes *hyd-1*.

- A. Frutos de plantas silvestres *S. lycopersicum* var. P73 regadas con solución control
- B. Frutos de plantas silvestres regadas con paclobutrazol (PAC).
- C. Frutos de plantas *hyd-1* regadas con solución control.
- D. Frutos de plantas *hyd-1* regadas con PAC.

2.1.2 Análisis de expresión de genes del metabolismo y señalización de GAs

El metabolismo de GAs ha sido objeto de numerosos estudios, en donde se han identificado los genes que codifican las diferentes enzimas implicadas en la síntesis y catabolismo de estas hormonas. Los pasos finales de la síntesis de GAs activas están catalizados por las enzimas GA20-oxidasas y GA3-oxidasas. Al mismo tiempo las GAs activas y sus precursores pueden ser inactivados irreversiblemente por las enzimas GA2-oxidasas (Sponsel and Hedden 2004; Rieu *et al.* 2008).

Específicamente en tomate se han identificado genes que codifican este tipo de enzimas, cuatro genes para GA20oxidasas, dos para GA3oxidasas, y cinco genes que codifican las enzimas inactivadoras de GAs, GA2oxidasas (Rebers *et al.* 1999; Serrani *et al.* 2007b). Teniendo en cuenta que se han relacionado cambios en los niveles de GAs con cambios en los niveles de transcritos de genes clave en la ruta de metabolismo y señalización de GAs (Fos *et al.* 2000; Olimpieri *et al.* 2007; Medina *et al.* 2013), nos propusimos analizar la expresión de algunos de estos genes en flores del mutante *hyd-1* utilizando la técnica de RT-qPCR por su alta sensibilidad. Se evaluaron dos estadios florales antes de la antesis (10 y 2 DAA), estos estadios se escogieron porque en el primero se observan diferencias morfológicas en el desarrollo de la flor de plantas mutantes y en el segundo se pudo diseccionar la flor separando estambres y carpelos, de esta manera se pretendía evaluar si los defectos del desarrollo observados en estos dos verticilos correlacionan con alteraciones en los niveles de transcritos de los genes.

En la Figura 21 se muestra la comparación de los niveles de transcritos de genes implicados en la biosíntesis de GAs activas entre flores de plantas *hyd-1* y plantas silvestres. En yemas florales (10 DAA), se observa como la expresión de los genes *SIGA20ox1*, *SIGA20ox2* y *SIGA3ox2* es superior en las flores del mutante, en valores de 1,4 veces para los genes *SIGA20ox1* y 2 y 3,16 veces para *SIGA3ox2* (Figura 21 A, C y D), mientras que los genes *SIGA20ox3* y *SIGA3ox1* no presentan ninguna alteración en los niveles del transcrito para esta primera etapa (Figura 21 B y E). En general, nuestros resultados indican que en yemas florales de plantas *hyd-1* (10 DAA) existe un aumento de expresión de los genes que codifican GA 20-oxidasas y GA 3-oxidasas, enzimas que catalizan las últimas etapas de la biosíntesis de GAs activas.

En el siguiente estadio evaluado, que corresponde a las flores recogidas dos días antes de la antesis (2 DAA), se observa que en los estambres de plantas *hyd-1* hay un descenso en los niveles de expresión del gen *SIGA20ox1* cercano al 96% (Figura 21 A), contrario a lo que ocurre con el gen *SIGA20ox2*, el cual aumenta su expresión en 5,8 veces el valor detectado en los estambres del silvestre (Figura 21 C). Para los demás genes analizados (*SIGA20ox3*, *SIGA3ox1* y *SIGA3ox2*) no se

observan cambios significativos de expresión en los estambres de cada línea (Figura 21 B, D y E). En relación al carpelo de flores *hyd-1* 2DAA, la expresión de los genes *SIGA20ox1*, *SIGA20ox3* y *SIGA3ox2* no varía respecto al silvestre. Sin embargo, los niveles del transcrito del gen *SIGA20ox2* muestran una reducción del 66% en el carpelo del mutante (Figura 21 C). Al mismo tiempo, se observa un incremento en la expresión del gen *SIGA3ox1* en el carpelo de plantas *hyd-1* (Figura 21 B), con un valor de 3,5 veces respecto al silvestre. Estos resultados indican, que en el ovario de plantas mutantes *hyd-1* existe un aumento importante en la expresión del gen *SIGA3ox1*, que codifica una de las enzimas responsable de la síntesis de GAs activas.

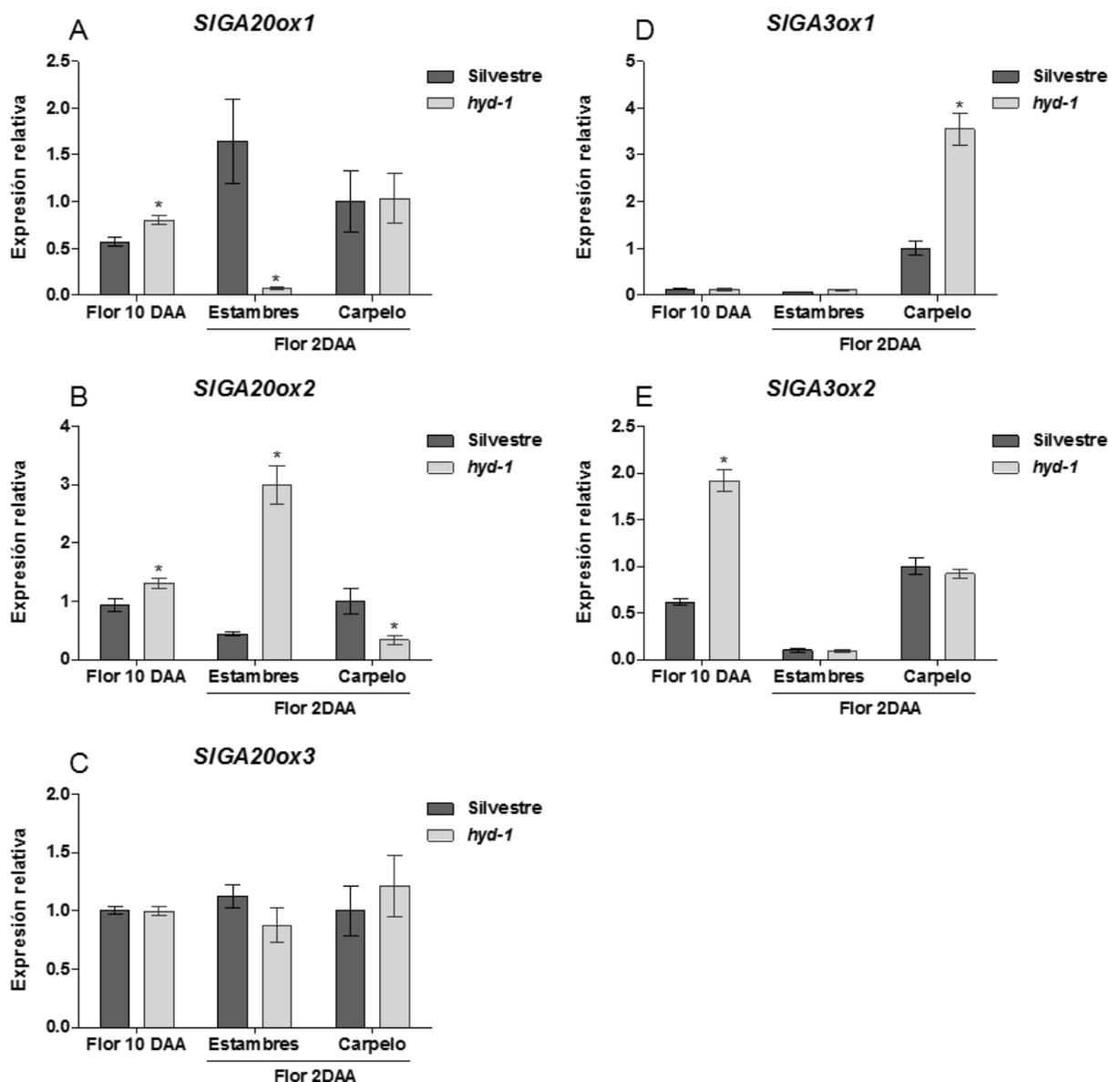


Figura 21. Niveles de expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de GAs activas en flores del mutante *hyd-1*. A. *SIGA20ox1*; B. *SIGA20ox2*; C. *SIGA20ox3*; D. *SIGA3ox1* y E. *SIGA3ox2*.

Se muestra la comparación en los niveles de transcritos de flores silvestres y flores *hyd-1* 10DAA y 2DAA.

Los valores son relativos al nivel de expresión de cada gen en el carpelo de flores silvestres 2DAA.

Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas.

El asterisco indica diferencias significativas de las plantas *hyd-1* respecto al silvestre ($p < 0,05$).

Por otra parte, el proceso de inactivación de GAs está mediado por la acción de las GA2oxididasas. En tomate se han aislado cinco genes codificantes de este tipo de enzimas (*SIGA2ox1* a *SIGA2ox5*) (Serrani, 2008). Nosotros hemos evaluado la expresión de los genes *SIGA2ox1* y *SIGA2ox2*, los cuales parecen tener un papel relevante en el proceso del desarrollo del ovario y la fructificación (Martínez-Bello 2014).

En yemas florales (10 DAA) de plantas mutantes *hyd-1* no se observan alteraciones en los niveles de transcritos para ninguno de los dos genes analizados (Figura 22 A y B). En el segundo estadio floral evaluado (2 DAA), la expresión del gen *SIGA2ox1* no presenta ningún cambio, ni en estambres ni en el carpelo de flores *hyd-1* (Figura 22 A). Mientras tanto, el gen *SIGA2ox2* presenta una disminución en los niveles del transcrito en ambos tejidos evaluados, donde la reducción es del 80% para los estambres y del 47% en el carpelo (Figura 22 B). Los resultados de este análisis indican que las flores *hyd-1* 2DAA, presentan una reducción en la expresión del gen *SIGA2ox2* que codifica una de las enzimas inactivadoras de GAs.

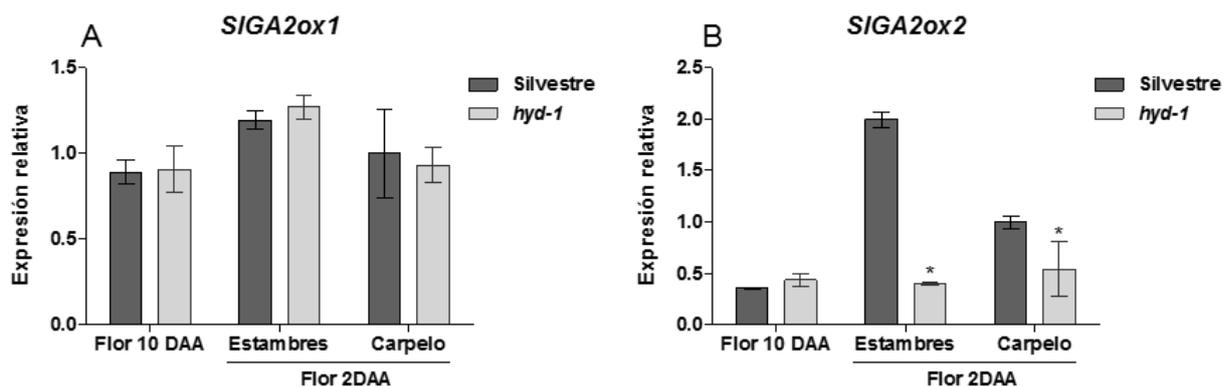


Figura 22. Niveles de expresión de genes que codifican enzimas inactivadoras de GAs en flores del mutante *hyd-1*. A. *SIGA2ox1* y B. *SIGA2ox2*.

Se muestra la comparación en los niveles de transcritos de flores silvestres y flores *hyd-1* 10DAA y 2DAA. Los valores son relativos al nivel de expresión de cada gen en el carpelo de flores silvestres 2DAA. Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas.

Otro de los transcritos evaluados fue el del gen *SIDELLA* que codifica un regulador central de la ruta de señalización por GAs. En tomate tan solo se ha identificado una proteína DELLA, la cual actúa como un regulador negativo de la fructificación y la disminución en los niveles de proteína induce la formación de frutos partenocárpicos (Martí *et al*, 2007, Carrera *et al*, 2012). En nuestro estudio hemos analizado la expresión del gen *SIDELLA* en las flores del mutante partenocárpico *hyd-1*. En el estadio floral 10DAA se detecta un leve incremento del mensajero, de 1,4 veces el valor detectado en el silvestre (Figura 23). Sin embargo, en la siguiente etapa evaluada (2 DAA) no se evidencia ninguna alteración de los niveles del transcrito, ni en los estambres, ni en el carpelo de flores del mutante *hyd-1* (Figura 23). El análisis de expresión indica que el gen *SIDELLA*

presenta un ligero incremento en los niveles del transcrito en las etapas iniciales del desarrollo de la flor en plantas *hyd-1*.

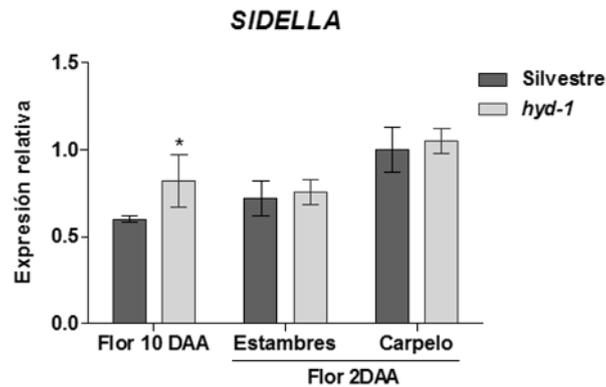


Figura 23. Niveles de expresión de SIDE LLA en flores del mutante *hyd-1*.

Se muestra la comparación en los niveles de transcritos de flores silvestres y flores *hyd-1* 10DAA y 2DAA. Los valores son relativos al nivel de expresión de cada gen en el carpelo de flores silvestres 2DAA. Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas.

2.1.3 Análisis de expresión de genes implicados en la ruta de señalización por auxinas

Como se dijo anteriormente, las auxinas desempeñan un papel importante en el desarrollo reproductivo de las plantas. Se ha descrito que existe un incremento en los niveles de auxinas en los órganos florales tras la fertilización de los óvulos (Gillaspy *et al.* 1993). Los análisis moleculares apuntan a que el crecimiento del ovario está bloqueado antes de la polinización y que estas hormonas están involucradas en la des-represión del crecimiento del ovario después de la fertilización (Pandolfini *et al.* 2007).

La regulación transcripcional dependiente de auxinas está mediada por proteínas pertenecientes a dos familias génicas, Aux/IAA (Auxinas/Indol-3-Ácido Acético Aux/IAA) y ARF (Factores de Respuesta a Auxinas) (Wang *et al.* 2005; Guillon *et al.* 2008; Serrani *et al.* 2008; Vriezen *et al.* 2008; de Jong *et al.* 2009a; de Jong *et al.* 2009b). En tomate se han identificado genes que codifican este tipo proteínas, y que además parecen tener un papel regulador en el proceso de fructificación. Dentro de este grupo se encuentran los genes *SIIAA9* y *SIIAA3* que codifican proteínas Aux/IAA (Wang *et al.* 2005; Chaabouni *et al.* 2009), y otros dos genes que codifican proteínas ARF, *SIARF8* y *SIARF7* (Goetz *et al.* 2007; de Jong *et al.* 2009b). Nosotros hemos analizado la expresión de estos cuatro genes en dos estadios florales (10 y 2 DAA) de la línea partenocarpica *hyd-1*.

En relación a los genes que codifican proteínas Aux/IAA, en yemas florales de plantas *hyd-1* (10 DAA), se observa un ligero incremento de expresión del gen *SIIAA3*, con un valor de 1,4 veces respecto al nivel observado en plantas silvestres (Figura 24 A). En esta misma etapa, para el gen

SIIAA9 no se detectan cambios en los niveles de expresión (Figura 24 B). En el siguiente estadio floral evaluado (2 DAA), el gen *SIIAA3* duplica su expresión en los estambres de flores *hyd-1*, respecto a los estambres de flores silvestre (Figura 24 A). Todo lo contrario ocurre con el gen *SIIAA9*, para el cual los niveles del transcrito se reducen a la mitad (Figura 24 B). En relación al carpelo de flores 2DAA en plantas *hyd-1*, no se observan cambios de expresión para ninguno de los genes *SIIAA* evaluados.

En cuanto a los genes que codifican factores de respuesta auxinas, se observa que en flores *hyd-1* 10 DAA los niveles de expresión de *SIARF7* no presentan ninguna alteración. Sin embargo, la expresión del gen *SIARF8* es ligeramente superior, para el cual se detecta un valor de 1,15 veces relativo al nivel detectado en silvestre (Figura 24 C y D).

En la siguiente etapa evaluada, en los estambres de flores 2 DAA en plantas *hyd-1*, los niveles de transcrito para el gen *SIARF7* disminuyen en un 34 % respecto a los valores normales (Figura 24 C), mientras que la expresión de *SIARF8* es superior, con un valor de 1,7 veces respecto a los valores en estambres de flores silvestres (Figura 24 D). Sin embargo, en el carpelo no se detectan alteraciones en los niveles de transcritos para ninguno de los dos genes (Figura 24 C y D).

Nuestros resultados apuntan a que seguramente la señalización por auxinas se encuentre desregulada desde las primeras etapas de desarrollo floral en plantas mutantes. Específicamente, los cambios más importantes en la señalización por auxinas se observan en los estambres de flores *hyd-1* 2DAA y corresponden a la activación de la señalización de auxinas.

Dentro de la señalización por auxinas, existe también un complejo que involucra una proteína F-box, la cual funciona como receptor de auxinas y se conoce con el nombre de TIR1 (*Transport Inhibitor Response1*) (Dharmasiri *et al.* 2005). En tomate se demostró que la proteína SITIR1 es un regulador positivo en el proceso de cuajado del fruto, debido a que la sobre-expresión del gen hace que se generen frutos partenocárpico (Ren *et al.* 2011). Al analizar los niveles del transcrito del gen *SITIR1* en plantas *hyd-1*, se observa un aumento de 1,6 veces los valores normales en flores 10DAA. En el segundo estadio analizado (2 DAA) no se detecta ninguna diferencia a nivel de estambres, sin embargo, en el carpelo, la expresión desciende a la mitad (53%) comparado con los valores obtenidos en flores silvestres (Figura 24 E). Por tanto, existe una desregulación en la expresión del receptor de auxinas durante todo el desarrollo floral en plantas mutantes, debido a que al principio del desarrollo la expresión del gen se incrementa y en el estadio más próximo a la anthesis los niveles del transcrito disminuyen.

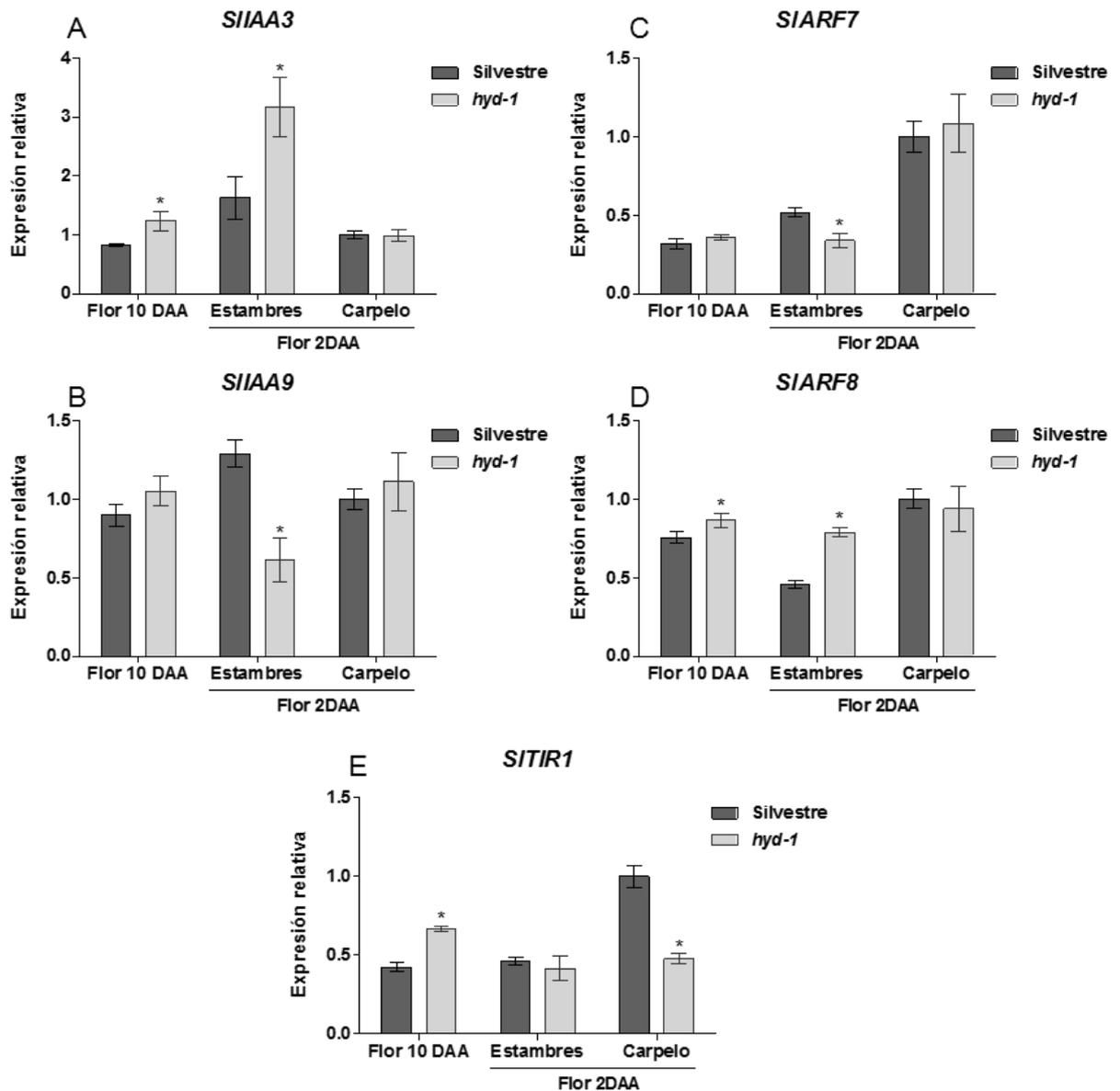


Figura 24. Niveles de expresión de genes que participan en la señalización por auxinas, en flores mutantes *hyd-1*.
A. *SIIAA3*; B. *SIIAA9*; C. *SIARF7*; D. *SIARF8* y E. *SITIR1*.

Se muestra la comparación en los niveles de transcritos de flores silvestres y flores *hyd-1* 10DAA y 2DAA.

Los valores son relativos al nivel de expresión de cada gen en el carpelo de flores silvestres 2DAA.

Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas.

Uno de los principales mecanismos que regulan la distribución de auxinas es el transporte polar, el cual está mediado por las proteínas PIN y AUX/LAX, las cuales controlan el flujo celular de salida y entrada de auxinas (Vanneste and Friml 2009). Existen estudios que indican como los genes *SIPIN1*, *SIPIN2* y *SIPIN4*, juegan un papel importante en el desarrollo reproductivo en tomate. En el caso de *SIPIN1* y *2* la expresión de los genes en ovarios inmediatamente después de la antesis y la localización del transcrito en el fruto y en los óvulos respectivamente, sugieren que estos dos genes están involucrados en las etapas tempranas de desarrollo del fruto (Nishio *et al.* 2010). Otros estudios muestran que el gen *SIPIN4* presenta altos niveles de expresión en flores y en los

primeros estadios de desarrollo del fruto (Mounet *et al.* 2012; Pattison and Catalá 2012). Además, el silenciamiento del gen causa el crecimiento precoz del frutos sin necesidad de que ocurra la polinización (Mounet *et al.* 2012). Basados en estos datos, nos propusimos evaluar la expresión de estos tres genes en flores de plantas mutantes *hyd-1*. Los resultados muestran que existe un incremento en los niveles del transcrito de cada gen en yemas florales de plantas *hyd-1* (10 DAA), en un orden de magnitud de 2,5 veces para *SIPIN1*, y 1,4 veces para *SIPIN2* y *SIPIN4* (Figura 25 A, B y C, respectivamente), respecto a los valores detectados en el silvestre. En flores *hyd-1* 2 DAA la expresión en los estambres aumenta para los genes *SIPIN2* y *SIPIN4* en valores de 3,5 y 1,9 veces respectivamente, y esta misma tendencia se observa en el carpelo de plantas mutantes donde la expresión es superior en valores de 1,5 veces para *SIPIN2* y 1,3 veces para *SIPIN4* respecto los valores de expresión detectados en el silvestre (Figura 25 B y C). Sin embargo, la expresión del gen *SIPIN1* disminuye en un 34% en el carpelo de flores *hyd-1* (Figura 25 A). En conjunto, nuestros resultados indican que existe un aumento de expresión de los genes que codifican proteínas transportadoras de auxinas *SIPIN1*, *SIPIN2* y *SIPIN4*, desde los primeros estadios de desarrollo floral.

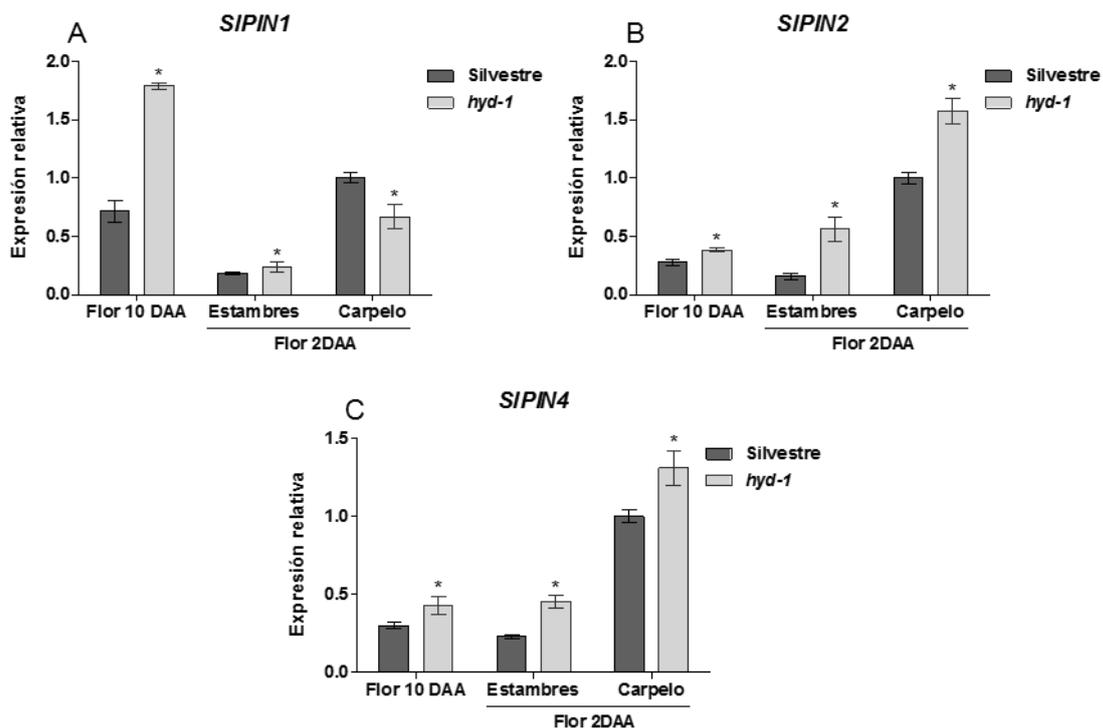


Figura 25. Niveles de expresión de genes *SIPIN* en flores de plantas mutantes *hyd-1*. Genes que codifican proteínas implicadas en el transporte polar de auxinas. A. *SIPIN1*; B. *SIPIN2*; C. *SIPIN4*.

Se muestra la comparación en los niveles de transcritos de flores silvestres y flores *hyd-1* 10DAA y 2DAA.

Los valores son relativos al nivel de expresión de cada gen en el carpelo de flores silvestres 2DAA.

Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas.

2.1.4 Evaluación de la distribución de auxinas en el ovario

Para evaluar con más detalle el patrón de distribución de auxinas en el ovario del mutante *hyd-1* se realizó una inmunolocalización de auxinas, que consistió en detectar la presencia de la hormona utilizando un anticuerpo específico para el ácido indól acético (IAA por sus siglas en inglés). La distribución de auxinas se evaluó en dos estadios previos a la antesis (12 DAA y 2DAA), en antesis y dos días después de la antesis.

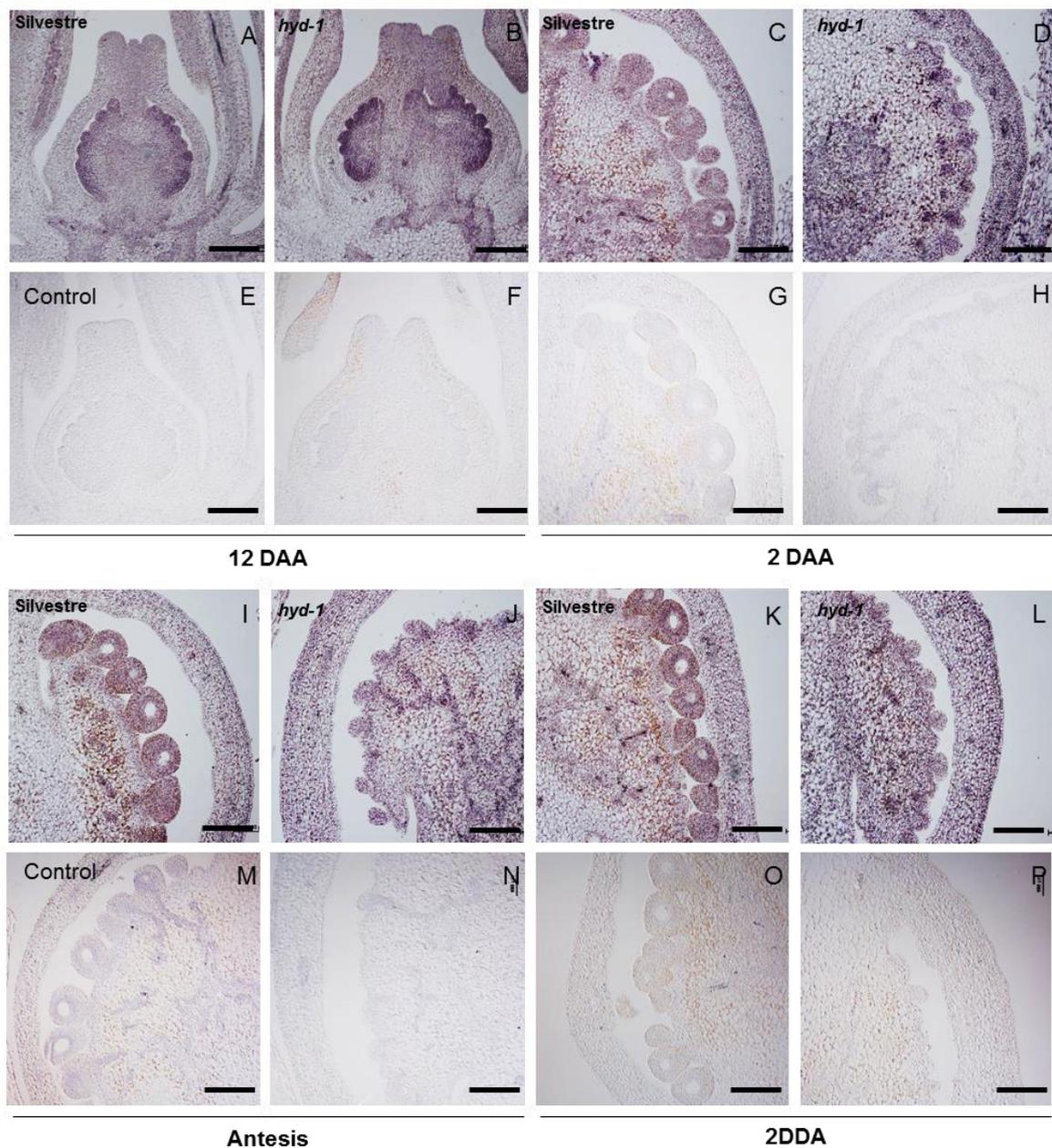


Figura 26. Inmunolocalización de auxinas (IAA) en distintos estadios de desarrollo floral en plantas *hyd-1* y plantas silvestres. Se muestran 4 estadios de desarrollo floral desde 12 DAA hasta 2DDA.

A-D e I-L. Inmunolocalización de auxinas.

E-H y M-P. Se muestra el control negativo de la inmunolocalización.

A, C, E, G, I, K, M y O. Flores de plantas silvestres.

B, D, F, H, J, L, N y P. Flores de plantas *hyd-1*.

La barra indica 200 μ m.

En la primera etapa evaluada (12 DAA) se detecta señal en los óvulos tanto en el ovario de plantas silvestres como en el de plantas mutantes (Figura 26, A y B). La intensidad de la señal se asocia a la acumulación de auxinas y esta es mayor en los óvulos de plantas mutantes (Figura 26, A y B). En este mismo estadio se observa la acumulación de auxinas en los estambres de plantas silvestres, específicamente en los sacos polínicos, algo que no ocurre en los estambres del mutante (Figura 26, A y B). Dos días antes de la antesis la acumulación de la hormona se detecta a lo largo de los haces vasculares y en los óvulos de flores silvestres (Figura 26, C), mientras que en el ovario de plantas *hyd-1* no se observa la acumulación de auxinas en el tejido vascular y en los óvulos, sino una distribución uniforme por todo los tejidos del ovario. Dicha distribución uniforme también se observa en los siguientes estadios evaluados, en antesis y dos días después de antesis (Figura 26, D, J y L). Estos resultados indican que existe una deslocalización de la hormona en el ovario de plantas mutantes *hyd-1*, antes, durante y después de la antesis; y probablemente esta deslocalización de auxinas podría ser responsable de las malformaciones de los gametos masculino y femenino, y ser la causa del desarrollo autónomo del ovario en las plantas mutantes *hyd-1*.

2.1.5 Determinación de la cantidad de auxinas y GAs

Con el fin de detectar posibles cambios en la cantidad de hormonas presentes durante el desarrollo floral de plantas *hyd-1*, se realizó la cuantificación de GAs y auxinas. El análisis fue realizado por el servicio de cuantificación de hormonas del IBMCP utilizando UPLC-espectrometría de masas. Para el análisis se tomaron flores de 10 DAA y 2 DAA. En estas últimas se hizo una fina disección separando los estambres y el carpelo. En el primer estadio evaluado se cuantificaron las GAs activas y las auxinas (IAA). En el siguiente estadio, se cuantificaron la mayoría de GAs, tanto las que corresponden a la ruta de la no hidroxilación como la de las pertenecientes a la ruta de la hidroxilación en el C-13, además de las auxinas.

Durante el primer estadio de desarrollo evaluado, se detectó que hay un incremento en la giberelina activa GA_4 , mientras que la GA_1 , la cual está catalogada como la giberelina activa más abundante en tomate (Fos *et al.*, 2000), disminuye. En flores 2DAA, los estambres de plantas mutantes no presentan diferencias en el contenido de GAs en comparación con las plantas silvestres, únicamente existe una reducción de GA_{51} , que es la forma inactiva de la GA_9 (Tabla 14). Por otra parte, en el ovario de flores *hyd-1* 2 DAA, la ruta de la no hidroxilación en el C-13 se encuentra alterada. El contenido de la giberelina activa GA_4 es menor que en las plantas silvestres, al igual que su precursor GA_9 y la forma inactiva de este (Tabla 14). En relación a la ruta de la hidroxilación en el C-13, en los ovarios de la línea mutante se detecta un descenso en el contenido

de tres precursores de la giberelina activa GA₁, así como de GA₂₉, la forma inactiva de GA₂₀ (Tabla 14). Sin embargo, los niveles de la giberelina GA₁ no se encuentran alterados en estas plantas.

La cuantificación de estas hormonas nos indica que hay un aumento en la concentración de la giberelina activa GA₄ en las flores de plantas *hydra* 10 DAA. Sin embargo, el incremento de concentración no se mantiene en el estadio próximo a la antesis. Por tanto, esto sugiere, nuevamente, que debe haber un mecanismo no mediado por GAs, implicado en el desarrollo de los frutos partenocárpicos en el mutante *hyd-1*.

A. Ruta de la no hidroxilación en el C-13

		GA ₁₅	GA ₂₄	GA ₉	GA ₅₁ GA inactiva	GA ₄ GA activa	GA ₁₂ GA inactiva	
Flor 10DAA	P73					0,19 ± 0,01		
	<i>hyd-1</i>					0,28 ± 0,01 *		
Flor 2DAA	Estambre	P73	0,97 ± 0,19	0,22 ± 0,12	0,17 ± 0,12	1,07 ± 0,16	0,14 ± 0,12	Indetectable
		<i>hyd-1</i>	1,12 ± 0,34	0,33 ± 0,03	0,22 ± 0,11	0,41 ± 0,03 *	0,25 ± 0,08	Indetectable
	Ovario	P73	1,15 ± 0,12	0,64 ± 0,12	0,08 ± 0,02	0,47 ± 0,04	0,52 ± 0,14	Indetectable
		<i>hyd-1</i>	0,78 ± 0,22	0,63 ± 0,24	0,04 ± 0,01 *	0,23 ± 0,02 *	0,21 ± 0,07 *	Indetectable

B. Ruta de la hidroxilación en el C-13

		GA ₅₃	GA ₄₄	GA ₁₉	GA ₂₀	GA ₂₉ GA inactiva	GA ₁ GA activa	GA ₈ GA inactiva	
Flor 10DAA	P73						0,43 ± 0,08		
	<i>hyd-1</i>						0,23 ± 0,02 *		
Flor 2DAA	Estambre	P73	0,42 ± 0,17	0,07 ± 0,02	6,29 ± 1,13	8,95 ± 5,43	9,58 ± 4,97	0,49 ± 0,16	7,08 ± 2,33
		<i>hyd-1</i>	0,29 ± 0,04	0,13 ± 0,04	8,14 ± 2,69	3,83 ± 1,12	1,68 ± 0,22	0,66 ± 0,19	6,54 ± 0,85
	Ovario	P73	0,00 ± 0,01	0,15 ± 0,03	29,6 ± 4,32	1,57 ± 0,30	4,69 ± 0,79	0,41 ± 0,19	6,18 ± 1,70
		<i>hyd-1</i>	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,03 *	13,2 ± 4,18 *	0,73 ± 0,42 *	1,36 ± 0,23 *	0,50 ± 0,22	7,58 ± 2,54

Tabla 14. Cuantificación de GAs en dos estadios de desarrollo floral de plantas *hyd-1*.

A. Ruta de la no hidroxilación en el C-13

B. Ruta de la hidroxilación en el C-13

Flores 10 Días Antes de la Antesis (DAA) y estambres y ovarios de flores 2 DAA.

Los datos representan la media de tres replicas biológicas, de la cantidad de GAs dada en ng/g.

En gris se señalan los precursores inmediatos de las GAs activas; en verde se señalan las GAs activas.

Los asteriscos señalan los valores donde existe diferencia significativa (p<0,05) en la comparación del mutante *hyd-1* con el silvestre (P73).

Por otra parte, la alteración en el transporte de auxinas en plantas *hyd-1* hacía pensar que el contenido de auxinas en las flores días antes de la antesis podría presentar cambios. Sin embargo, al realizar la cuantificación de la hormona, se evidencia que no existen diferencias en los niveles de auxinas en plantas mutantes *hyd-1* respecto al silvestre, ni en los primeros estadios de desarrollo ni en los estambres y carpelos de flores antes de la antesis (Tabla 15). Estos datos

indican, que a pesar de estar alterado el transporte de auxinas en las flores de plantas partenocárpicas *hyd-1*, la cantidad de la hormona presente en la flor no cambia.

		IAA (ng/g)
Flor 10DAA	P73	6,42 ± 0,07
	<i>hyd-1</i>	6,15 ± 0,8
Flor 2DAA	Estambre P73	1,3 ± 0,3
	<i>hyd-1</i>	2,8 ± 1,3
Ovario	P73	11,3 ± 1,3
	<i>hyd-1</i>	11,5 ± 3,4

Tabla 15. Cuantificación de ácido indol acético (IAA) en dos estadios de desarrollo floral de plantas *hyd-1*.

Flores 10 Días Antes de la Antesis (DAA) y estambres y ovarios de flores 2 DAA.

Los datos representan la media de tres replicas biológicas, del contenido de ácido indol acético (IAA) dado en ng/g.

No existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos para el mutante *hyd-1* y el silvestre (P73).

3 MAPEO GENÉTICO DEL LOCUS *HYDRA*

Con el fin de identificar la localización del locus *HYDRA* en el genoma del tomate, hemos realizado un mapeo posicional. En primer lugar, se generó una población de mapeo segregante para la mutación *hydra*. Para ello se realizaron cruces entre plantas mutantes *hyd-1* en heterocigocis y plantas de la especie silvestre *Solanum pimpinellifolium*. Esta especie se escogió ya que existen marcadores polimórficos basados en PCR que diferencian entre una especie y otra. La población de mapeo se obtuvo tras la autofecundación de la población F1. De los 6 cruces realizados, uno segregó para el fenotipo mutante en la población F2 y a partir de esta población se seleccionaron 34 plantas homocigotas para la mutación.

3.1 Localización cromosómica

Para la localización cromosómica de la mutación se utilizaron marcadores moleculares tipo InDels. Se ha generado una colección de marcadores que abarcan todo el genoma de tomate en intervalos de 40cM aproximadamente (ftp.solgenomics.net/maps_and_markers/LippmanZ/). A partir del DNA genómico de 13 plantas homocigotas para la mutación, se amplificaron los fragmentos polimórficos descritos para los distintos marcadores. Las frecuencias de recombinación calculadas para estos marcadores y la transformación de estas frecuencias en distancias de mapa, permitió localizar la mutación en el extremo del cromosoma 7 y por debajo del marcador Ch7-15. El marcador Ch7-15 se encuentra a una distancia de 30.7 cM de la mutación *hydra*; mientras que para el siguiente marcador (Ch7-25) no se identificaron plantas recombinantes.

3.2 Mapeo fino del locus *HYDRA*

Para el mapeo fino de la mutación *hydra* dentro del cromosoma 7, se utilizaron marcadores tipo HRM. Estos marcadores permiten detectar polimorfismos en un solo nucleótido o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Algunos de los marcadores utilizados durante el mapeo, fueron cedidos amablemente por el grupo del Dr. Antonio Monforte (IBMCP) y otros se diseñaron a partir de secuencias génicas disponibles en la página www.solgenomic.com. La amplificación de fragmentos se realizó a partir del DNA genómico proveniente de 34 plantas recombinantes, homocigotas para la mutación *hydra*. La detección de polimorfismos se realizó mediante el análisis de curvas de fusión de alta resolución. En un primer análisis se identificó que la mutación se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7, encontrando cuatro plantas recombinantes para el marcador Solcap_snp_sl_12149 y dos plantas recombinantes para el marcador Solcap_snp_sl_70595 (Figura 28). Para continuar acotando el fragmento se diseñó un nuevo marcador (Solcap_snp_sl_71003) en una posición intermedia entre los dos marcadores descritos anteriormente. Utilizando este marcador hemos acotado la posición de la mutación *hydra* entre los marcadores Solcap_snp_sl_71003 y Solcap_snp_sl_70595, en un fragmento de DNA de aproximadamente 2MB. Wang y colaboradores estimaron que en tomate la densidad génica para la eucromatina es, en promedio, un gen cada 6,7 Kb (Wang *et al.* 2006) por lo que el fragmento identificado podría contener alrededor de 300 genes.

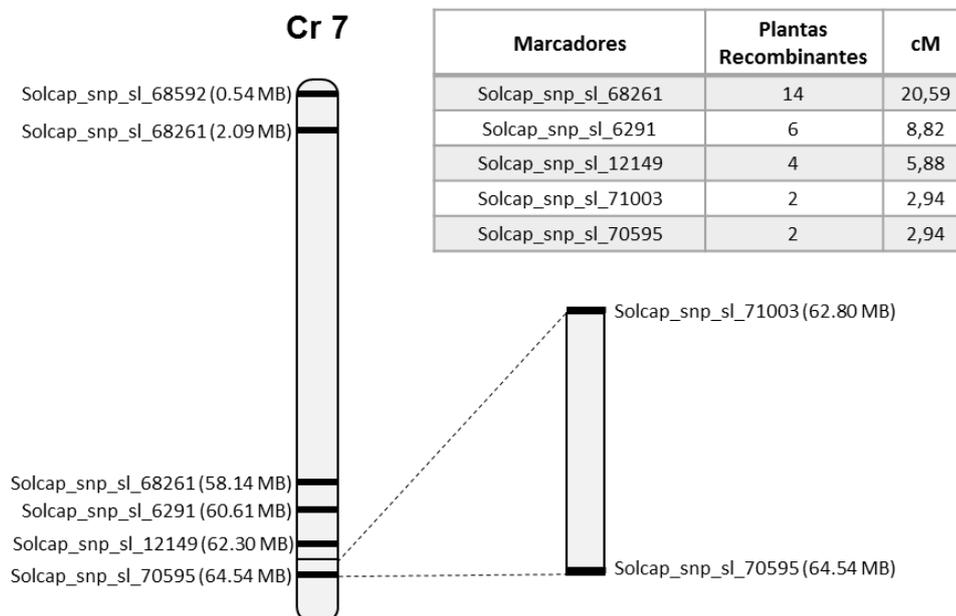


Figura 27. Localización del locus *HYDRA*.

Se representa la localización de la mutación *hydra*, así como el genotipo de las plantas analizadas para los marcadores que flanquean la mutación y la distancia estimada en centimorgans (cM).

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

El cuajado del fruto es uno de los procesos más importantes en la producción de frutos carnosos. El estudio de la regulación durante este proceso es fundamental para comprender los mecanismos moleculares que controlan la fructificación y así poder diseñar estrategias de mejora del cultivo. A pesar de la gran importancia del cuajado la mayoría de investigaciones se han centrado en analizar la maduración del fruto y aún es escasa la información que se tiene acerca de las etapas iniciales de la formación del fruto. El estudio de la partenocarpia podría ayudar a comprender los mecanismos genéticos y moleculares que regulan el proceso de cuajado. Además, desde el punto de vista de la mejora biotecnológica, la partenocarpia ofrece ventajas respecto al desarrollo normal del fruto, incrementando las tasas de cuajado en condiciones ambientales subóptimas para la polinización y fertilización.

Con el fin de identificar nuevos genes que controlan el proceso de cuajado del fruto y profundizar en la comprensión del desarrollo de partenocarpia ligada a androesterilidad en tomate, hemos caracterizado el mutante partenocárpico *hydra* de tomate. Este mutante es estéril y el ovario crece en ausencia de polinización produciendo frutos partenocárpicos.

4 La mutación *hydra* causa malformaciones en la flor asociadas a la formación de frutos partenocárpicos

La caracterización morfológica de los mutantes *hydra* (*hyd-1* e *hyd-2*) reveló que las flores presentan malformaciones tanto en los estambres como en el ovario desde etapas tempranas del desarrollo floral. En primer lugar los estambres son alargados, macizos y no hay desarrollo del polen. Así mismo los óvulos presentan forma de gancho y no tiene lugar la formación del saco embrionario. Es decir, la mutación *hydra* afecta el desarrollo del gametofito masculino y femenino. La gametogénesis involucra procesos celulares importantes que incluyen división celular, diferenciación y morfogénesis, los cuales están coordinados por múltiples señales hormonales, ambientales y del desarrollo. Para que se lleve a cabo al desarrollo de gametofitos primero debe ocurrir la esporogénesis, un proceso que se inicia mediante la diferenciación de un conjunto de células dentro de la antera y el ovario que darán lugar al tejido esporogénico. Posteriormente, dicho tejido se somete a divisiones meióticas para formar las microsporas y megasporas (Yang and Sundaresan 2000b; Capron *et al.* 2009).

En plantas mutantes *hydra* están bloqueados los procesos de esporogénesis y gametogénesis tanto masculina como femenina. En *Arabidopsis*, se han identificado distintos genes que participan en la especificación de las líneas germinales femenina y masculina (Revisado por Wilson y Yang 2004; Bencivenga *et al.* 2011; Xing 2011). En particular, el gen *SPOROCTELESS/NOZZLE* (*SPL/NZZ*), tiene un papel esencial en la iniciación de la esporogénesis

tanto en los órganos masculinos como femeninos. Este gen codifica una proteína nuclear, posiblemente un factor transcripcional (Schiefthaler *et al.* 1999; Yang *et al.* 1999; Balasubramanian and Schneitz 2000; Balasubramanian and Schneitz 2002). El mutante de pérdida de función *spl* muestra esterilidad tanto del gametofito femenino como del masculino (Schiefthaler *et al.* 1999; Yang *et al.* 1999), de manera similar a lo observado en el mutante *hydra*. En ambos mutantes las alteraciones en las anteras y en los óvulos se observan desde los primeros estadios de desarrollo y no se observan anomalías ni en el número de órganos florales ni durante el desarrollo vegetativo (Schiefthaler *et al.* 1999; Yang *et al.* 1999). La principal diferencia que existe entre estos dos mutantes, es que mientras que en el mutante *spl* las silicuas no se desarrollan, en el mutante *hydra* se producen frutos partenocárpicos. En nuestro laboratorio un resultado similar se obtuvo tras la introducción de una construcción quimérica del promotor específico de anteras *PsEND1* fusionado a un gen citotóxico, en plantas de *Arabidopsis thaliana*, *Brassica Napus*, *Nicotiana tabacum* y *Solanum lycopersicum*. En todos los casos las anteras no se desarrollaron, pero mientras que las plantas que producen frutos secos fueron estériles (Roque *et al.* 2007), en tomate (fruto carnoso) el ovario inició su crecimiento en ausencia de fertilización, produciendo frutos partenocárpicos (Medina *et al.* 2013).

Es interesante ver como en muchos casos la androesterilidad se asocia a la obtención de frutos partenocárpicos en distintas variedades y, de hecho hace algunos años se propuso que los estambres producen una señal represora del desarrollo del ovario antes de que ocurra la fertilización (Vivian-Smith *et al.* 2001). En manzano, el mutante Rae Ime, que no posee pétalos ni estambres debido a la pérdida de función del gen homólogo a *PISTILATA* (*MdPI*) desarrolla frutos sin necesidad de polinización (Yao *et al.* 2001). Por otra parte, en tomate, la reducción de la expresión de los genes *TM8* y *TM29* (homólogos de los genes *SEPALLATA*) originan cambios de identidad de sépalos y estambres, así como la formación de frutos partenocárpicos (Lifschitz *et al.* 1993; Ampomah-Dwamena *et al.* 2002). También el mutante *parthenocarp fruit* (*pat*) que presenta flores con estambres aberrantes y óvulos no funcionales, desarrolla frutos en ausencia de fertilización (Mazzucato *et al.* 1998). Así mismo, el mutante de pérdida de función del gen *STAMENLESS* de tomate (homólogo de *AP3*) se caracteriza por la ausencia de estambres y la producción de frutos sin semillas (Gómez *et al.* 1999; Quinet *et al.* 2014). Nuestros resultados del estudio de las plantas partenocárpicas *hydra*, muestran que la alteración en el desarrollo de anteras se presenta desde los primeros estadios de desarrollo floral, lo cual apoya la idea de que en el silvestre, las anteras en desarrollo son la fuente de una señal represora hacia el ovario que evita que éste inicie su crecimiento antes de la polinización y fertilización.

Algunos estudios de partenocarpia, en distintas especies, señalan que los óvulos tienen también un papel central durante el cuajado y el crecimiento del fruto (Revisado por Sotelo-Silveira *et al.* 2014). En *Arabidopsis*, el mutante *fruit without fertilization (fwf; arf8-4)* desarrolla frutos partenocárpicos (Goetz *et al.* 2006) y en combinación con el mutante *aberrant testa shape (ats)*, que contiene un solo integumento, se incrementa el desarrollo de frutos partenocárpicos, lo que sugiere que la modificación del integumento del óvulo influye en este fenotipo (Vivian-Smith *et al.* 2001). Así mismo, el mutante *bel1*, donde los integumentos del óvulo se convierten en estructuras carpeloides, en combinación con *fwf* (doble mutante *bel1 fwf*), también aumenta el desarrollo de frutos partenocárpicos (Vivian-Smith *et al.* 2001). La carencia de integumentos en los óvulos asociada a la partenocarpia, se observa también en el mutante partenocárpico de *Annona squamosa*, el cual es una fenocopia del mutante *ino* de *Arabidopsis* (Lora *et al.* 2011). Algo similar ocurre en el mutante *hydra*, en el cual no se observa la formación de integumentos, lo cual apoya la idea de que posiblemente exista una conexión entre el desarrollo anormal de integumentos y la partenocarpia (Sotelo-Silveira *et al.* 2014).

En conjunto, nuestros resultados del análisis del mutante *hydra* ponen de manifiesto la conexión entre el desarrollo anormal de los gametofitos (polen y óvulos) y la formación de frutos partenocárpicos, sugiriendo un papel central del desarrollo de los gametos en el control del cuajado y desarrollo del fruto, al menos en esta especie.

5 Base hormonal del fenotipo mutante *hydra*

El control hormonal sobre el proceso de fructificación ha sido ampliamente estudiado. Los avances en este proceso han identificado que las principales hormonas que actúan durante el cuajado del fruto son las auxinas y las GAs (Serrani *et al.* 2007a; de Jong *et al.* 2009a). Además, existe evidencia de que la interacción entre auxinas y GAs es necesaria para la coordinación del desarrollo del fruto y de las semillas (Ozga and Reinecke 2003). El éxito de la fructificación depende del correcto desarrollo de la flor, en donde dichas hormonas también desempeñan un papel muy importante (Yu *et al.* 2004; Aloni *et al.* 2006; Cheng and Zhao 2007). El desarrollo de frutos partenocárpicos en las plantas mutantes *hydra* está regulado hormonalmente y parece estar asociado a cambios en la expresión de genes relacionados con la señalización hormonal por parte de GAs y auxinas.

En relación a las GAs, durante las primeras etapas de desarrollo floral de plantas *hydra* existe un aumento en la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de GAs activas (*SIGA20ox1*, *SIGA20ox2* y *SIGA3ox2*). Incrementos en los niveles de expresión de estos genes en el ovario se han correlacionado con el aumento en la concentración de GAs. En

concreto, la sobre-expresión del gen *CcGA20ox1* en tomate genera un incremento en el contenido de GA₄ (García-Hurtado *et al.* 2012). Acorde con lo anterior, en plantas *hyd-1* el nivel de GA₄ en flores 10 DAA es mayor que en plantas silvestres. En contraste, la concentración de GA₁ (la giberelina bioactiva predominante en tomate) disminuye en plantas *hyd-1* comparada con plantas silvestres, para esta misma etapa. Algo similar fue observado en los frutos de plantas transgénicas de tomate que sobre-expresan el gen *CcGA20ox1*, en dónde los niveles de las GAs pertenecientes a la ruta de 13-hidroxiación fueron más bajos que en las plantas silvestres (García-Hurtado *et al.* 2012). Este hecho puede deberse a la competencia por sustrato (GA₁₂) entre la enzima GA 20-oxidasa sobre-expresada y la enzima endógena GA 13-hidrolasa, dejando un flujo constante a través de la ruta de la no 13-hidroxiación que lleva a una reducción de los niveles de GA₁ (Eriksson *et al.* 2000; Vidal *et al.* 2003; García-Hurtado *et al.* 2012). Adicionalmente, durante este mismo estadio floral (10 DAA), la expresión del gen *SIDELLA* está inducida en plantas *hyd-1*. Se ha establecido que las proteínas DELLA son represores centrales de diferentes procesos del desarrollo dependientes de GAs (Dill *et al.* 2001; Daviere and Achard 2013). Los altos niveles de GA₄ en las flores de plantas *hyd-1* 10 DAA, posiblemente promueven la degradación de la proteína SIDELLA, permitiendo el crecimiento prematuro del ovario en etapas previas a la antesis. La degradación de la proteína SIDELLA induciría la expresión del gen, por un efecto de retroalimentación positiva. De manera similar, la aplicación exógena de GAs en ovarios no polinizados incrementan la expresión del transcrito del gen *SIDELLA* (Serrani *et al.* 2008).

A pesar del aumento del contenido de GAs activas al inicio del desarrollo floral, en estadios próximos a la antesis se observa una disminución de GAs pertenecientes a ambas rutas. En plantas partenocárpicas, en dónde el crecimiento del fruto depende de la acción de GAs, la aplicación de PAC en ovarios no polinizados bloquea el crecimiento del ovario (Fos *et al.* 2001; Medina *et al.* 2013). Sin embargo, en plantas *hyd-1* el crecimiento del ovario no se detiene tras la aplicación de PAC. Estos resultados sugieren que el crecimiento autónomo del ovario en plantas mutantes *hydra* no está inducido por la acción de las GAs, y que debe existir otro mecanismo que desencadena la partenocarpia.

En tomate, se ha demostrado que el efecto de las auxinas sobre el cuajado y desarrollo del fruto en tomate está mediado, parcialmente, por las GAs (Serrani *et al.* 2008). Sin embargo, los mismos autores sugieren que las auxinas tienen funciones adicionales en el desarrollo del fruto independientemente de las GAs. La caracterización molecular del mutante *hydra* indica que la señalización de auxinas está desregulada en estadios previos a la antesis. Aunque en nuestros análisis no hemos detectado cambios en la concentración total de IAA en los ovarios de plantas

hyd-1, en comparación con las plantas silvestres, no podemos descartar que existan cambios locales de concentración.

Diversos estudios han identificado genes que codifican proteínas Aux/IAA y factores de respuesta a auxinas (ARFs) asociados al proceso de fructificación. Dentro de este grupo, los genes *SIIAA9* y *SIARF7* han sido clasificados como reguladores negativos de la respuesta a auxinas durante el cuajado del fruto, mientras que el gen *SIARF8* se considera un activador transcripcional de la respuesta a auxinas (de Jong *et al.* 2009a). En yemas florales de plantas *hyd-1* se observó un aumento de expresión del gen *SIARF8* y del gen de respuesta rápida a auxinas *SIIAA3*, lo cual sugiere que la ruta de señalización por auxinas se encuentra activada en etapas tempranas del desarrollo de la flor. En etapas posteriores, en donde se llevó a cabo la disección de la flor, observamos cambios de expresión de todos los genes analizados implicados en la señalización por auxinas pero únicamente en los estambres y no en el ovario. Estos cambios indican que, aunque la concentración total de auxinas no está incrementada, el mecanismo de señalización por auxinas está activado en los estambres de flores *hyd-1* en los estadios previos a la antesis. Se ha descrito que existe una comunicación entre los estambres y el ovario (Vivian-Smith *et al.* 2001). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis y sugieren que durante su formación los estambres inhiben el crecimiento del ovario no fertilizado. Basándonos en la información obtenida a lo largo de este trabajo y en los modelos propuestos en la bibliografía, nosotros proponemos un modelo para el cuajado del fruto en tomate, en el cual los procesos de gametogénesis femenina y masculina generan una serie de señales que reprimen el crecimiento del ovario antes de que ocurra la polinización y fertilización, en un proceso regulado por auxinas (Figura 28).

Uno de los mecanismos principales que regulan la distribución de las auxinas es el transporte polar, del cual depende el flujo direccional de la hormona y el establecimiento de gradientes (Wiśniewska *et al.* 2006; Swarup *et al.* 2008; Petrášek and Friml 2009). El establecimiento de gradientes de auxinas es fundamental para el desarrollo de los gametofitos. En *Arabidopsis*, la formación de los primordios de óvulos requiere la acumulación local de auxinas (máximos de auxinas) que dependen de la expresión del transportador de auxinas *PIN1*, que a su vez se requiere en las etapas iniciales del desarrollo del saco embrionario en los óvulos (Ceccato *et al.* 2013; Galbiati *et al.* 2013). La presencia de primordios de óvulos en las plantas mutantes *hydra* y la acumulación de auxinas en este tejido en yemas florales (10DAA), sugiere que en estadios tempranos del desarrollo floral se establecen gradientes de auxinas. Sin embargo, en estadios posteriores no se mantienen los gradientes, lo cual tiene como consecuencia que no se desarrolle el saco embrionario en estas plantas.

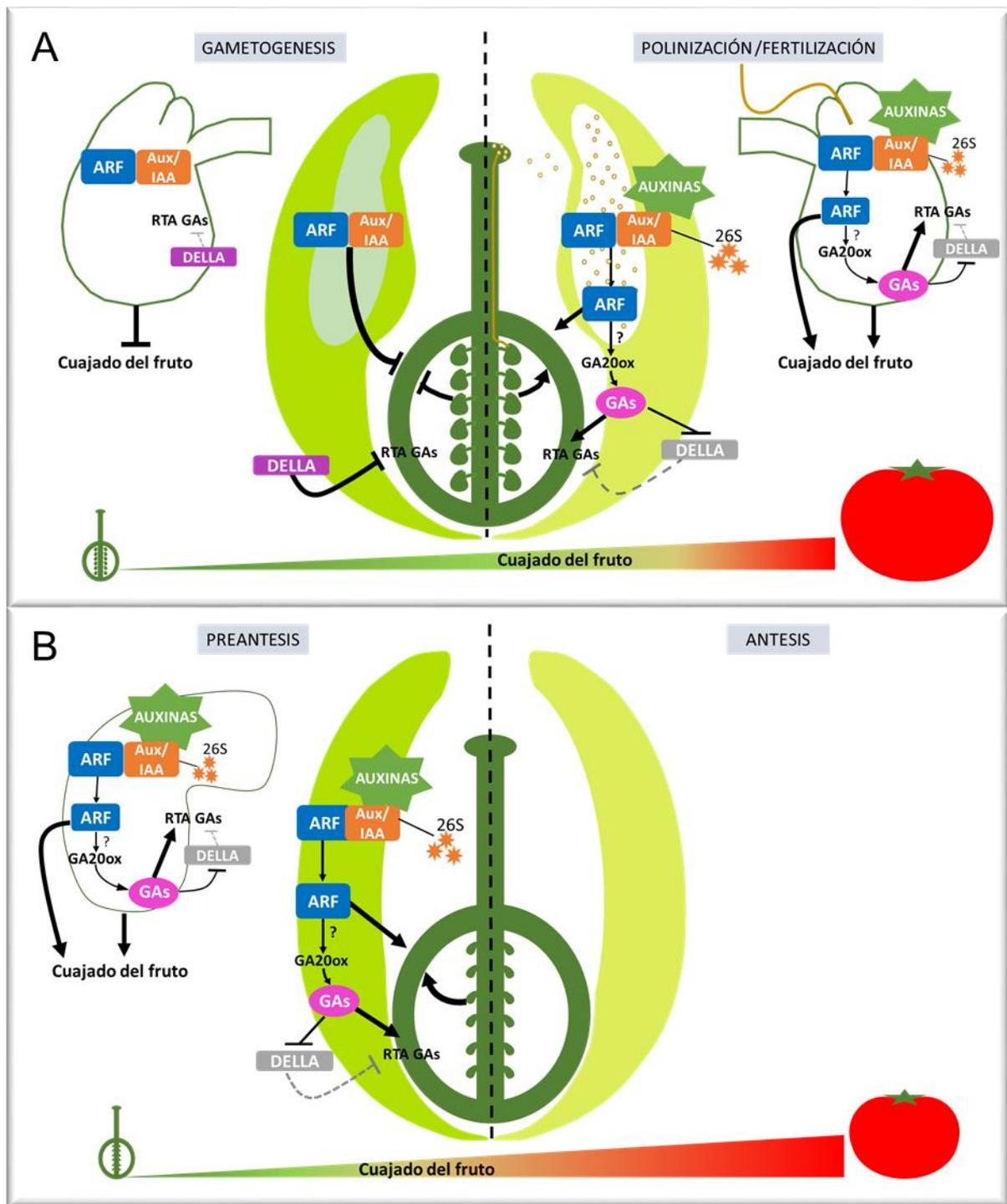


Figura 28. Modelo propuesto del papel de los gametos en el proceso de cuajado del fruto en tomate.

A. En plantas silvestres el desarrollo de gametos (gametogénesis) estaría reprimiendo el cuajado del fruto previo a la polinización y fertilización. En estambres y óvulos, las proteínas reguladoras Aux/IAA formarían heterodímeros con los factores de respuesta auxinas (ARF) reprimiendo la señalización por auxinas y el crecimiento del ovario. La polinización y fertilización conducirían a un incremento localizado de auxinas. La unión de las auxinas a la proteína receptora F-box permite la degradación de las proteínas Aux/IAA vía proteosoma 26S, liberando los ARFs. Posteriormente, los ARFs libres regularían los genes de respuesta a auxinas, activando el cuajado del fruto. Al mismo tiempo, los ARFs, directa o indirectamente, podrían inducir la biosíntesis de GAs. Las GAs liberan la represión de las proteínas DELLA activando su degradación y permitiendo que se lleve a cabo la respuesta a GAs (RTA GAs). De esta manera se promovería el cuajado del fruto en tomate. Modelo adaptado de (Alabadi *et al.* 2009; Dorcey *et al.* 2009; Sotelo-Silveira *et al.* 2014).

B. En flores de plantas mutantes *hydra*, no tienen lugar los procesos de gametogénesis masculina ni femenina y en consecuencia no se generan las señales represoras que reprimen el crecimiento del ovario no polizado. Durante los estadios previos a la antesis (Preantesis), la señalización por auxinas estaría activada tanto en los estambres como en los óvulos y el ovario comenzaría su crecimiento prematuro en ausencia de polinización y fertilización.

Diversos estudios demuestran que los principales genes implicados en el transporte de auxinas durante el desarrollo floral y el cuajado del fruto en tomate son *SIPIN1*, *SIPIN2* y *SIPIN4* (Nishio *et al.* 2010; Mounet *et al.* 2012; Pattison and Catalá 2012). El gen *SIPIN4* presenta altos niveles de expresión en flores y en los primeros estadios de desarrollo del fruto (Mounet *et al.* 2009; Pattison and Catalá 2012) y su silenciamiento causa el crecimiento precoz del frutos sin necesidad de que ocurra la polinización (Mounet *et al.* 2009). En plantas mutantes *hyd-1* el incremento en los niveles de transcritos de los genes *SIPIN1*, *SIPIN2* y *SIPIN4*, sugiere que el transporte polar de auxinas se encuentra alterado durante el desarrollo floral en etapas previas a la antesis. El aumento de expresión de los genes podría tener como resultado un incremento de la cantidad de transportadores o alternativamente, puede que se deba a un efecto de retroalimentación positiva, ocasionado por bajos niveles de las proteínas que codifican. En cualquier caso, la alteración en el transporte de auxinas podría dar lugar a la distorsión en el patrón de distribución de la hormona. Esta deslocalización de las auxinas posiblemente sea la causa de la ausencia de los gametofitos y del crecimiento del ovario en ausencia de fertilización en los mutantes *hydra*.

6 La mutación *hydra* representa una nueva fuente de partenocarpia

Como resultado del mapeo posicional hemos podido identificar que la mutación *hydra* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7. A lo largo de los años se han identificado distintas fuentes de partenocarpia, entre las cuales se encuentran los mutantes *pat*. El mapeo de los locus o QTLs asociados a la partenocarpia indica que ninguno de ellos se encuentra en el cromosoma 7. El mapeo del locus *pat-1*, reveló que este locus está localizado en el brazo largo del cromosoma 3 (Beraldi *et al.* 2004), al igual que el locus *pat-2*, derivado de la variedad *Severianin* (Vardy *et al.* 1989). Gorguet y colaboradores (2008) han estudiado la genética de las líneas de introgresión *IL51* y *ITV-line 1*, las cuales tienen capacidad para desarrollar frutos sin semillas. Para la línea *IL51* se han identificado dos QTL asociados a la partenocarpia. El primero, denominado *pat-4.1*, está situado en el centrómero del cromosoma 4 y el segundo, denominado *pat-5.1*, se ubica en el cromosoma 5 (Gorguet *et al.* 2008). A su vez, la partenocarpia de la línea *ITV-line 1* está controlada al menos, por dos QTLs, uno situado cerca del centrómero del cromosoma 4 (*pat 4.2*) y otro cerca del telómero del brazo largo del cromosoma 9 (*pat-9.1*)(Gorguet *et al.* 2008). Por su parte la línea “RP 75/59” que presenta partenocarpia facultativa, está constituida por dos genes recesivos, no alélicos, a los que ha denominado *pat-3/pat-4* (Nuez *et al.* 1986). Aunque actualmente se desconoce la localización cromosómica de estos dos genes, la partenocarpia asociada a los genes *pat-3/pat-4* no parece estar relacionada con la partenocarpia de los mutantes *hydra*, ya que a diferencia de *pat-3/pat4*, los mutantes *hydra* desarrollan partenocarpia obligada.

La mutación *hydra* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7, donde no se ha identificado ningún otro locus o QTL asociado a la partenocarpia. Por tanto, esta mutación representa una nueva fuente de partenocarpia en tomate.

7 Interés biotecnológico de la mutación *hydra*

En tomate, la partenocarpia es considerada una característica atractiva para mejorar las tasas de cuajado del fruto. Durante muchos años se han desarrollado diferentes estrategias encaminadas a la obtención de frutos partenocárpicos en tomate. Una de ellas es la aplicación de reguladores de crecimiento como auxinas y GAs, los cuales inducen el cuajado del fruto y permiten la obtención de frutos en condiciones ambientales desfavorables (Chamarro 1995). Sin embargo, el uso de estos productos incrementa los costes de producción, lo que hace que estas prácticas se utilicen con baja frecuencia. Además, para algunas variedades se ha descrito que la aplicación de fitorreguladores genera malformaciones en el fruto, así como características asociadas a mala calidad, lo cual hace que su comercialización sea limitada (Abad and Monteiro 1989; Serrani *et al.* 2007a). Dicho esto, el carácter de partenocarpia asociado a la mutación *hydra*, podría ser utilizado como una herramienta muy interesante para mejorar las tasas de cuajado de variedades comerciales en condiciones de estrés climático, principal causa de disminución del rendimiento en muchos sistemas productivos.

Adicionalmente, se ha descrito que la ausencia de semillas mejora la calidad de los frutos (Varoquaux *et al.* 2000). Nuestros resultados indican que en los frutos del mutante *hyd-1* hay un incremento en la cantidad de sólidos solubles, los cuales son un indicativo de la cantidad de azúcares presentes en el fruto. Este aumento en la cantidad de sólidos solubles, genera un incremento del índice de sabor de los frutos. La introgresión de la mutación *hydra* en variedades comerciales podría repercutir positivamente en la calidad del fruto de las nuevas variedades.

Por otra parte, la ausencia de semillas asociada a la partenocarpia, es un carácter valorado por los consumidores (Rotino *et al.* 2005) y por la industria de procesado de tomate (zumo y pasta de tomate), donde la presencia de semillas representa una desventaja ya que éstas incrementan el sabor amargo del producto y deben ser retiradas (Varoquaux *et al.* 2000). En este sentido, el hecho de que los frutos de plantas portadoras de la mutación *hydra* carezcan de semillas podría representar una reducción de los costes de producción para las empresas de procesado.

V. **CAPITULO II:**

**CARACTERIZACIÓN DEL GEN *SIDOF10* Y DE SU
PAPEL EN EL CUAJADO DEL FRUTO EN TOMATE**

ANTECEDENTES

Con el fin de estudiar los procesos de cuajado y desarrollo del fruto en tomate, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un análisis transcriptómico global del desarrollo autónomo del ovario en las plantas transgénicas partenocárpicas de tomate *PsEND1::barnasa* (Medina 2010). En estas plantas el gen citotóxico barnasa es dirigido específicamente a las anteras por el promotor del gene *PsEND1* de guisante (Roque *et al.* 2007). Las plantas de tomate transformadas con esta construcción producen flores androestériles y los ovarios de estas plantas se desarrollan dando lugar a frutos sin semillas (partenocárpicos). En el análisis transcriptómico se utilizó la micromatriz de oligos TOM2 (<http://ted.bti.cornell.edu/cgi-bin/TFGD/array/home.cgi>), que contiene 12.190 oligonucleótidos que representan cerca de 12.000 unigenes (aproximadamente el 30 % de la totalidad del genoma del tomate). Se evaluaron cinco estadios florales comprendidos entre 6 días antes de la antesis y 2 días después de la antesis, comparando con ovarios de plantas silvestres de la variedad Micro-Tom. Los resultados obtenidos mostraron que la mayor actividad transcripcional se encuentra en los estadios 1 (6 días antes de antesis) y 4 (antesis), donde se evidencia un gran número de genes inducidos y reprimidos (Figura 29). Los cambios transcripcionales de unigenes asociados a procesos de regulación han sido abundantes y corresponden principalmente a factores de transcripción y a genes implicados en la modificación y degradación de proteínas (Medina 2010).

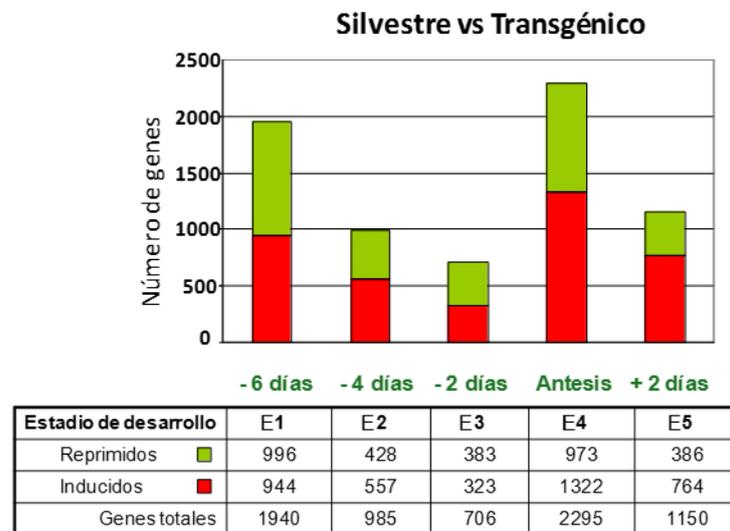


Figura 29. Cambios globales de expresión en ovarios transgénicos *PsEND1::barnasa* respecto a ovarios silvestres durante los 5 estadios de desarrollo floral analizados. Las barras representan el número total de unigenes expresados diferencialmente, en color verde se representan los genes reprimidos y en color rojo los genes inducidos (adaptado de Medina, 2010). (Medina 2010).

Con base en los resultados del análisis transcriptómico, se seleccionó dentro del primer estadio, un grupo de genes que presentan homología con factores de transcripción tipo *Zinc finger* (23

unigenes). De estos genes 12 se encuentran inducidos y 11 reprimidos en el genotipo transgénico durante el estadio más temprano del ovario analizado. Como una primera aproximación al estudio funcional de estos genes, se llevaron a cabo experimentos de silenciamiento transitorio en plantas de tomate de la variedad Micro-Tom utilizando la técnica denominada VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*). Entre los genes analizados se observó que el silenciamiento del unigen SGN-U221271 interfiere con el cuajado del fruto ocasionando una disminución en el número de frutos por inflorescencia y también en la formación de las semillas. Este gen se encuentra inducido en el ovario de las plantas transgénicas *PsEND1::barnasa* respecto a las plantas silvestres, durante la primera etapa de desarrollo floral (Figura 30). Estos resultados y la disponibilidad de ESTs (Expressed Sequence Tags) o marcadores de secuencia expresada para este gen en las bases de datos (<http://solgenomics.net/>) nos llevaron a seleccionarlo como un buen candidato para estudiar su papel en el proceso de cuajado y desarrollo del fruto en tomate.

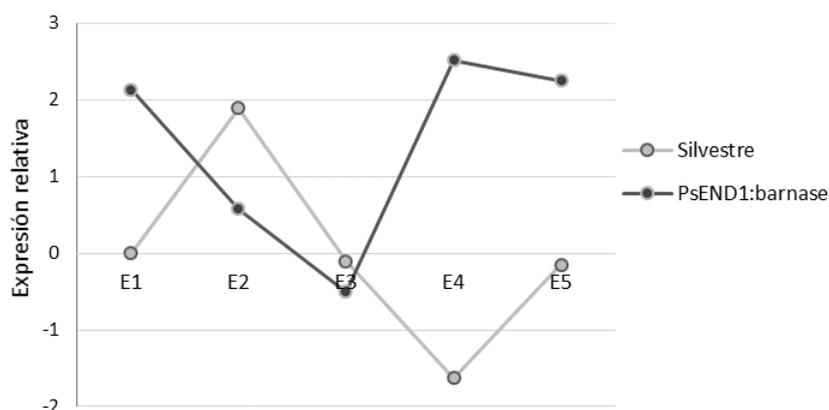


Figura 30. Nivel de expresión del unigen SGN-U221271, durante el desarrollo del ovario de plantas silvestres y plantas partenocárpicas *PsEND1::barnasa*.

Se muestran los niveles del transcrito en diferentes estadios de desarrollo floral. Estadio 1: 6 días antes de antesis (DAA); 2: 4DAA; 3: 2DAA; 4: Antesis; 5: dos días posteriores a la antesis.

Los datos de expresión se han transformado en unidades lineales. Los valores de expresión en cada punto son relativos a los niveles de expresión en el genotipo silvestre para el primer estadio (E1).

RESULTADOS

1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL UNIGEN SGN-U584226 (*SIDOF10*)

1.1 Análisis *in silico*

El unigen SGN-U221271 actualmente corresponde al unigen SGN-U584226 que está conformado por 7 ESTs representadas en 4 librerías, una de las cuales es de ovario. La secuencia del unigen SGN-U584226 fue analizada *in silico*, e incluye la secuencia codificante de 783 pb flanqueada por una región 5' no traducida (5' UTR) de 97 pb y una región 3' no traducida (3' UTR) de 176 pb. El alineamiento de esta secuencia con las secuencias de tomate disponibles en la base de datos del NCBI mediante BLAST obtuvo 3 resultados. Uno de ellos corresponde a un cDNA (GenBank: AK320640.1) expresado en hoja, lo cual sugiere que este gen posiblemente se expresa en tejidos diferentes del ovario donde ha sido identificado en nuestro laboratorio. Las otras dos secuencias con que alinea son secuencias genómicas de tomate (AC232774 y AC226517), aparentemente idénticas, localizadas en el cromosoma 2. El alineamiento entre las secuencias genómicas y la secuencia de cDNA revela la ausencia de intrones.

La secuencia deducida de aminoácidos produce una proteína de 260 residuos que posee un punto isoeléctrico teórico de 9,08 y un peso molecular de 28,5 kDa calculados con la herramienta *Compute pI/Mw* en el servidor *ExpASy* (http://web.expasy.org/compute_pi/). En el análisis bioinformático de la secuencia proteica se pudo identificar la presencia de un dominio *Zinc Finger* (Figura 3). Existen diferentes tipos de proteínas *Zinc Finger*, que han sido clasificadas de acuerdo al número y orden de los residuos de cisteína e histidina que coordinan el átomo de Zinc, como C2H2, C2HC, C2C2, C2HCC2C2, C2C2C2C2, etc. (Ciftci-Yilmaz and Mittler 2008). La proteína deducida del unigen SGN-U584226 presenta un único *Zinc finger* de tipo C2C2, también denominado dominio DOF (*DNA-binding with one finger*) (Figura 31). Las proteínas de la familia DOF presentan una copia del dominio, el cual se encuentra generalmente localizado en la región N-terminal, y consiste en 4 residuos de cisteína conservados Cx2Cx21Cx2C (donde X representa cualquier aminoácido) que coordinan el átomo de Zinc (Yanagisawa 2002). Al mismo tiempo, dentro de la secuencia proteica se identificaron numerosos aminoácidos básicos, como arginina (R) y lisina (K), que sugieren la presencia de una señal de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés) (Figura 31).

Cai y colaboradores (2013), identificaron 34 genes que codifican factores de transcripción tipo DOF en el genoma del tomate, los cuales están distribuidos en 11 cromosomas. Dentro de los

genes identificados se encuentra el unigen SGN-U584226, al cual denominaron *SIDOF10*, razón por la cual a partir de este momento el gen en estudio se denominará *SIDOF10*.

En ese mismo estudio, se identificaba al gen *SIDOF31* como un parálogo del gen *SIDOF10*, sugiriendo que ambos genes se han originado a partir de un mismo evento de duplicación génica (Cai *et al.* 2013). Por esta razón, se decidió realizar un análisis comparativo entre ambos genes.

```

gatttattactctctttcacatctttcattctatcatcaaaagagtaaaactaagagcaatc
tcatttgcttttctcttcttttcttttttttaaaaaatgattcaagagctggttgagga
                                     M I Q E L F A G
aacactacacttatcggaatgataatatttctaaaattactccttctctctccaatt
N T T L I G N D N I S K I T P S S S P I
tctggtactacttctaattccaatattgccctgcaagtgcaaatgcaaactctgaaaat
S G T T S N S N I A P A S A N A N S E N
cttaaagtccgctgttgattccccaaacaccaagttttgttactacaacaactacaat
L K C P R C D S P N T K F C Y Y N N Y N
ttaactcagcctcgtcatttctgcaagacttgctcgacttattggactaaaggaggcgcg
L T Q P R H F C K T C R R Y W T K G G A
ttacgcaacgcttctataggtgggggttgcaaaaaaacaagtccatcgctacatcaaaa
L R N V P I G G G C K K N K S I A T S K
tcaactgctgcaaaattcaaaaattcacttccgtttgagtttatgggaaaatcaagcatt
S T A A K F K N S L P F E F M G K S S I
tttggaggggttcgagcaggaataataccttcaaattatgataataataacccttttctc
F G G F E Q E I I P S N Y D N N N P F L
ttttcctcacctcatcagaatcataatcctattctttccttacttaaggaaaatcttcat
F S S P H Q N H N P I L S L L K G N L H
aatcaattggagtgatcaatttcttccaacaacgggtatggaataataattatgaa
K S I G V N Q F P S N N G I W K N N Y E
gaaaacggttggtgaagtcagaatagtcgaggatttcaagagctatatcaaaggctaaaa
E N V G E V Q N S R G F Q E L Y Q R L K
gcgtaacaaatcgatgttatacagataatgcatggaccatcatcatcgtaaatgatt
A S T N R C Y T D N M H G P S S S S M I
ttggattcggctccggtaactggaggagagttgggttgctggaacccgaccctttcaaca
L D S A P V T G G E L G C W N P T L S T
tggttgatctgccaacagcaaatggggcatalctttaaataagtaatttactatctt
W L D L P T A N G A Y L *
tactattaggggtgaaggggtgcatgagatggttgggtatactggggatacttggacatgg
gtgtggcttagatcttatttatttatttctgttttctcttttgctttttgtgtgtgttt
catctataaaaatcaatgtactaaatttatttttc
    
```

Figura 31 Secuencia nucleotídica y proteína *SIDOF10* de *Solanum lycopersicum*. En cuadro se señalan los codones de inicio y finalización de la transcripción, en negrita se indica la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida, el dominio DOF constituido por 52 aa está subrayado. En rojo se indican los cuatro residuos de cisteína característicos del dominio Zinc Finger tipo Dof. En azul se señalan los aminoácidos básicos y posible señal de localización nuclear.

1.1.1 Comparación de secuencias de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31*

Estos dos parálogos se encuentran en distintos cromosomas, *SIDOF10* en el cromosoma 2 y *SIDOF31* en el cromosoma 11. Las secuencias genómicas de estos genes difieren en su tamaño y en la presencia de intrones; mientras que la secuencia de *SIDOF10* no presenta intrones, *SIDOF31* posee una secuencia genómica de 1825 nucleótidos que contiene dos intrones. En la comparación

1	MIQELFAGNTTLLI-GN-----DNISKI-----	21	S1DOF10
1	MIQELFAGNTTLLIGGGDNNISKLSNI-----	27	StDOF
1	MIQELLG-G-AGLIGGET-KISIAGTI-----LEGT--PSHSPS--	34	RcDOF
1	MIQELGGG-AGLIGGER-KITINGGI-----LEAS--PSPSPS--	35	VvDOF
1	MIQELGG---ALIAGERKPSSINGGGGGVLLPITTPSPSS--	40	GmDOF17.4
1	MIQELGGASASLIAGER-KISITNGGGA---LLLTPPTSSSPS--	40	GmDOF01.3
1	MIQELFGGAGLNNIAGGGERKSLT-----FHGGTTSS--	33	MdDOF5
1	MIQELGGA--AGFISGDR-KISITGSI-----FEGTSPLPCTTTTATVTTTTATAAP	52	CcDOF
1	MIQELLG-G-AGLIGGER-KIPINATI-----LEGT--PSPSPS--	34	PtDOF
	*****:.		
22	--TPSSSPIGTTNS-----NIAPAS--ANANSENLRCPRCDSPTNKFCYNNYNTQF	72	S1DOF10
28	--TPSSPICTTNS-----NIPPAASANANSENLRCPRCDSPTNKFCYNNYNTQF	80	StDOF
35	-LSPSSSTT-TTSATAATATATTTANSTTSSTSENLRCPRCDSNTKFCYNNYNTQF	92	RcDOF
36	-PSPSSSS-GNTTT-----VTAAAATSSASENLRCPRCDSNTKFCYNNYNTQF	87	VvDOF
41	--FPSSTSDVTLTSTTTTAAATAATTTTAVENLRCPRCDSNTKFCYNNYNTQF	98	GmDOF17.4
41	-LSPSCTTS-IT-----TSTATATSSSENQNLRCPRCDSNTKFCYNNYNTQF	89	GmDOF01.3
34	SLSPSPSPS-SSTTTA---TATTTATAGLSNTEENLRCPRCDSNTKFCYNNYNTQF	88	MdDOF5
53	PPPPPLPT-TTTSNTDSNIGNNTNNTSSNSGNNQNLRCPRCDSNTKFCYNNYNTQF	111	CcDOF
35	-LSPSPSPS-SSTTSA---ATTSATNSTPSSAQENLRCPRCDSNTKFCYNNYNTQF	88	PtDOF
	* . : ** : *****		
73	RHFCKTCRRYWTKGGALRNVPIGGGCRKNKSIATSKS-----TAAFKNSLPFE	121	S1DOF10
81	RHFCKTCRRYWTKGGALRNVPIGGGCRKNKITITAKS-----TAAKLKNSLPFE	129	StDOF
93	RHFCKTCRRYWTKGGALRNVPIGGGCRKNKNTVVSAS-----VAKSSNNKMK-TMV-S	143	RcDOF
88	RHFCKTCRRYWTKGGALRNVPIGGGCRKNKNTSVSTA-----VGKSSAGKAK-SAV-S	138	VvDOF
99	RHFCKTCRRYWTKGGALRNVPIGGGCRKNKNSIGVASS-----VAGKTASTKMK-TIA-S	150	GmDOF17.4
90	RHFCKTCRRYWTKGGALRNVPIGGGCRKSKSSGMSNS-----VAKQTATKMK-AVA-S	140	GmDOF01.3
89	RHFCKTCRRYWTKGGALRNVPIGGGYRKNKNSVTGSTA-----SIDKTAAGKTK-TVV-S	140	MdDOF5
112	RHFCKTCRRYWTKGGALRNVPIGGGCRKNKNSSTVTAASFGKSSSSSAANKMK-TVA-Y	169	CcDOF
89	RHFCKTCRRYWTKGGALRNVPIGGGCRKNKNTSVSAS-----VGKSGTNKMK-TMA-S	139	PtDOF
	*****:.*. : * * :		
122	FMGKS-SIFGGFEQEIIIPSNYDNNNPFLFS-SPHQNHNPILSLLKGNL-----	167	S1DOF10
130	LIGKS-GIFGEFEQEIIIPSN---NNPFLFS-SPHQNHNPILSLLGNHHS-----	174	StDOF
144	EIGRS-SFGNVFDHEL--P---SSSPIMWA-SPHNSH--LLTLLRANHNPNPNSTT---L	191	RcDOF
139	EIGKS-GLGGGFDEI--P---SNPILWA-SPQNSH--LLALLRATQNPNPNSP---I	185	VvDOF
151	EFGKSPGFGGGFEVEHELP--PPPGQILWG-SPQNSH--LLALLRATQNPNPNP---S	202	GmDOF17.4
141	ELGRS-SSQGLLDQEL--P---QTPAILWG-SPQNSQ--LMALLRANQNHNPNP---S	188	GmDOF01.3
141	EIGRS-GFGAGFDQEV--Q---ASPILWG-SPQNSH--LLALLKASHHQNPNPNQ---L	187	MdDOF5
170	EIGRG-GFVHH-PHEY--Y---SSTPIMWNNSPHNSQ--LLALLRATQNPNPINPTGPSTS	220	CcDOF
140	DIGRS-GFGNGFEHEL--S---SSPIMWA-SPQNSH--ILALLRATQNPNPNS--T---L	184	PtDOF
	:*:. . * : : : ** : : : : ** . .		
168	-----HKSIGVN-----QFPSNNGIWKNNY	187	S1DOF10
175	--LNFVKDE-----HKSIGYN-----QFPNNGLWKNNY	201	StDOF
192	SNSLGVKEETGC-MIGTQMAETT-GATGALN-ARTLGMHLSQ-VPSLGLCSPFWKNSQ	247	RcDOF
186	SNSVTVKD-DGV-MIGSHMTSESG-VGTGAVNIARNMGLDLHLNQ-LPSIGLCSYWRNNQ	241	VvDOF
203	P--MSLKEEGT--LLGHMVSTDQP-LVSNLTLSTYRTLYDAVAQVPSLGL---FGRNNQ	254	GmDOF17.4
189	PMSIVVKEGNL-MGSHMVAEPL-LANGLLNPTSLGFDGVEVLPSLGLCGSFWRNNQ	246	GmDOF01.3
188	CNSVNVKEEGMNMIGSHMTTEA---IAMSTARTLGLDPVCQ-APSLGLCSSFWRNNN	242	MdDOF5
221	TSSVRVKEEQGV-IGTHHVIKGEVPGDAAVLNSTGMVFNPLSQQLQ-VPSQLGLWKNQ	278	CcDOF
185	SNSIFVKE-EGG-LIGNQFISEPG-VGTAALN-ARTLGLDPIQ-VPSLGLCSPFWKSN-	238	PtDOF
	: : . : ..		
188	EEN-----VG-EVQN-SRGFQELYQRLKASTN---RCYTDNMHGP----	222	S1DOF10
202	QENV-----SSIVG-EVQN-SRGFQELYQRLKASTN---RCYPDSIHGP----	240	StDOF
248	NQAQHH-----QONGFIVG-EAQN--SGIQELYQRLRSST---NTYYTD-NSSVVL	292	RcDOF
242	HQTQQHQQNSHHQQNGFILG-EVQN--TGIQELYQRLRSST---NYTTHD-SP-VVLS	292	VvDOF
255	DQQQ-----QNGGLVGEHNN--SGIQELYQKLRSSSTVNNNYCSNNSQMFEMG	303	GmDOF17.4
247	DQTQQ-----QNGFALG-EHQS--SGVQELYHKLRSSTSS--INYCGSD-NSPVFLS	293	GmDOF01.3
243	QDQP----PPSHHQNGFIVGHEVQSSNIQIELQRLTPSTSQSCSYSDQLNNVASS	298	MdDOF5
279	HQIQAP-----QNGFLVGEVQN--SGVQELYQRFKSSSTN---NYADHLASPVVLS	326	CcDOF
239	----QH-----QONGFTVG-EAQN--SGIQELYQRLRSST---NYTTHD-PSAIVLS	279	PtDOF
223	-----SS--SSMILDSAPVT-GGELGC-WNPTLSTW-LDLPTANGA--YL	260	S1DOF10
241	-----SSSSSMILDSAAVA-GGELGF-WNPTLSTW-LDLPTANGA--YL	280	StDOF
293	NVGSS-STSSNILESSPVA-GGELGY-WNPTFS-W-SDLPTTNGA--YP	335	RcDOF
293	NA---VSS--SSSILESAPIA-GGELGY-WNPTFS-W-SDLPTTNGA--YP	332	VvDOF
304	NMASNYSSSVSNILETTSVA-GGEFGYWNPTFSNW-SDLPTTNGAGAYP	352	GmDOF17.4
294	NMASS-SSS-LSNILESSVS-GSEFGC-WNPTLS-W-SDLPTTNGA--YP	336	GmDOF01.3
299	SSSLSYS-TSSILDSSPVVGGGEMGYSWNPFAWTFDLPTTNGA--YH	346	MdDOF5
327	NAA---SS-TTILESAPVA-GGELGY-WNPVFS-W-SDLSTNGS--YP	366	CcDOF
280	NVATSSSTS-TSILESAPVA-GGELGY-WNPVFS-W-SDLPTTNGA--YP	323	PtDOF
	. * : : : * . * : * : : * * * : * : *		

Figura 33. Alineamiento de la proteína deducida SIDOF10 de *Solanum lycopersicum* con proteínas tipo DOF de otras especies de plantas.

El alineamiento de las proteínas homólogas se realizó utilizando el programa clustal omega (<http://www.uniprot.org/>). La línea roja indica la secuencia consenso del dominio DOF de 52 aa. Los 4 residuos de cisteína que conforman el dominio DOF se señalan en recuadros rojos. En azul se destacan los aminoácidos básicos de la secuencia consenso de localización nuclear bipartita. Pt: *Populus trichocarpa*; Rc: *Ricinus communis*; Vv: *Vitis vinifera*; Md: *Malus domestica*; Gm: *Glycine max*; St: *Solanum tuberosum* y Cc: *Citrus clementino*.

En el alineamiento se observa una región muy conservada correspondiente al dominio *Zinc Finger* (Figura 33). Al mismo tiempo en el extremo N-terminal de las proteínas DOF se evidencian 5 aminoácidos bien conservados (MIQEL). En el extremo C-terminal aunque no hay un alto nivel de homología, se observan dos grupos de aminoácidos conservados. Adicionalmente, en este alineamiento, se pudo identificar que en la región C-terminal del dominio DOF hay cuatro residuos bien conservados del aminoácido básico arginina (R) y cuatro de lisina (K) (Figura 31 y 33). Lo que indica la presencia de una posible señal de localización nuclear. Datos experimentales obtenidos en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, muestran que en las proteínas DOF existen dos posiciones de aminoácidos básicos conservados, implicados en su localización nuclear, la primera posición localizada en medio del dominio DOF y la segunda localizada en su C-terminal, que forman una secuencia bipartita de localización nuclear (Krebs *et al.* 2010). Las dos posiciones descritas se evidencian en la secuencia proteica de SIDOF10 y en las demás proteínas analizadas (Figura 33). Por tanto, la proteína SIDOF10 presenta una señal de localización nuclear bipartita, que posiblemente se requiera para su translocación al núcleo. Estas secuencias podrían resultar clave para la función de SIDOF10 como un posible factor de transcripción.

1.1.3 Análisis filogenético

Con el objetivo de ubicar el evento de duplicación que dio origen a los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* en un contexto temporal, se realizó una filogenia incluyendo 16 secuencias nucleóticas homólogas de genes DOF de diferentes especies eudicotiledoneas. Para enraizar el árbol se utilizó la secuencia de un gen homólogo de la gimnosperma *Picea abies*. En este punto, cabe resaltar que ninguna de las proteínas homólogas encontradas ha sido caracterizada.

La topología del árbol filogenético muestra que los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* están ubicados en clados diferentes (Figura 34). Cada uno de ellos presenta una estrecha relación con su respectivo ortólogo de la especie vegetal *Solanum tuberosum*. La interpretación de esta filogenia sugiere que la duplicación génica que dio origen a los genes *SIDOF10* y *SIDOF31*, es una duplicación ancestral previa a la diversificación de las especies incluidas en el análisis.

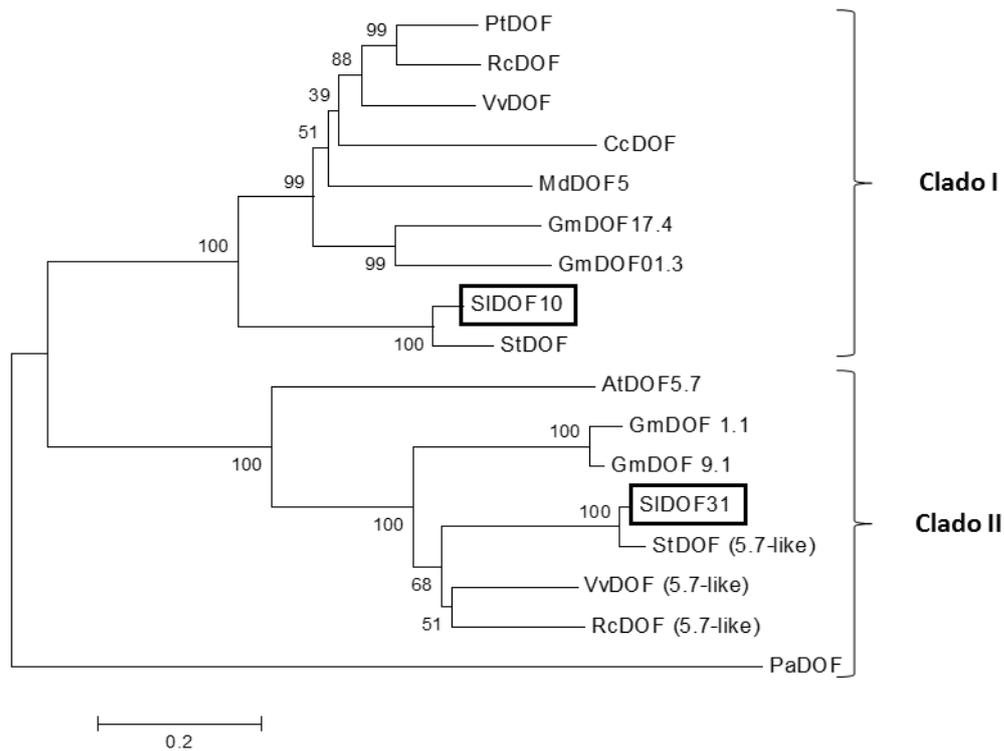


Figura 34. Análisis filogenético de genes homólogos a *SIDOF10* y *SIDOF31* de diferentes especies vegetales.

El número próximo a los nodos indican los valores de *bootstraps* de 1000 réplicas.

Pt: *Populus trichocarpa*; Rc: *Ricinus communis*; Vv: *Vitis vinifera*; Md: *Malus domestica*; Gm: *Glycine max*; Cc: *Citrus clementino*; Sl: *Solanum lycopersicum*; St: *Solanum tuberosum*, At: *Arabidopsis thaliana*; Pa: *Picea abies*.

1.2 Localización subcelular de la proteína SIDOF10

Como se mencionó previamente, las proteínas pertenecientes a la familia DOF presentan un dominio de unión a DNA en la región N-terminal. Esta región contiene una serie de aminoácidos básicos altamente conservados que han sido caracterizados como una señal de localización nuclear bipartita (Krebs *et al.*, 2010). En este trabajo se ha evaluado si esta secuencia conservada es funcional en la proteína codificada por el gen *SIDOF10*. Para ello se hizo un análisis de localización subcelular de la proteína, mediante la expresión transitoria de *SIDOF10* fusionado a un gen reportero que codifica la proteína YFP (*Yellow fluorescent Protein*), en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Hemos realizado dos construcciones, en una de ellas el gen reportero se fusionó en el extremo 5' de la secuencia codificante del gen *SIDOF10* (*35S::YFP-SIDOF10*) (Figura 35 A); en la segunda construcción el gen reportero se fusionó al extremo 3' de *SIDOF10* (*35S::SIDOF10-YFP*) (Figura 35 B). Una vez se tuvieron las construcciones se transformó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58, con cada una de ellas por separado. Posteriormente se realizó la agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana* y finalmente, al cabo de dos días, las hojas se observaron en el microscopio confocal.

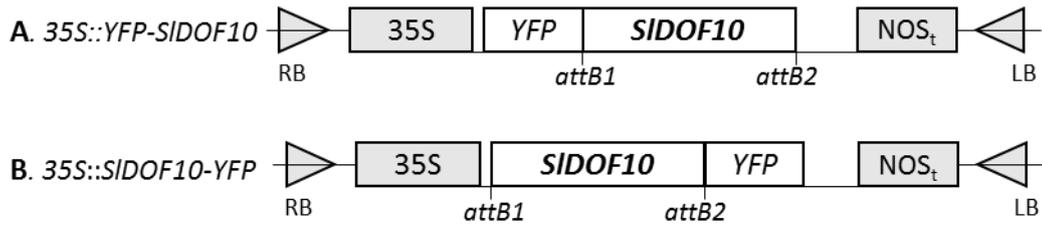


Figura 35. Esquema de las construcciones generadas para evaluar la localización subcelular de la proteína SIDOF10.

A. La secuencia génica de la proteína fluorescente YFP se fusionó al extremo 5' del gen *SIDOF10*.

B. La secuencia génica de la proteína fluorescente YFP se fusionó al extremo 3' del gen *SIDOF10*.

attB1 y *attB2* son los sitios de recombinación Gateway.

En la figura 36 se puede observar como la señal de la proteína YFP fusionada a SIDOF10 tanto en el extremo C-terminal como en el N-terminal, se detecta en el núcleo. Por tanto, nuestros resultados indican que a nivel subcelular la proteína SIDOF10 está localizada en el núcleo, lo cual es consistente con idea de que esta proteína actúe como un factor de transcripción.

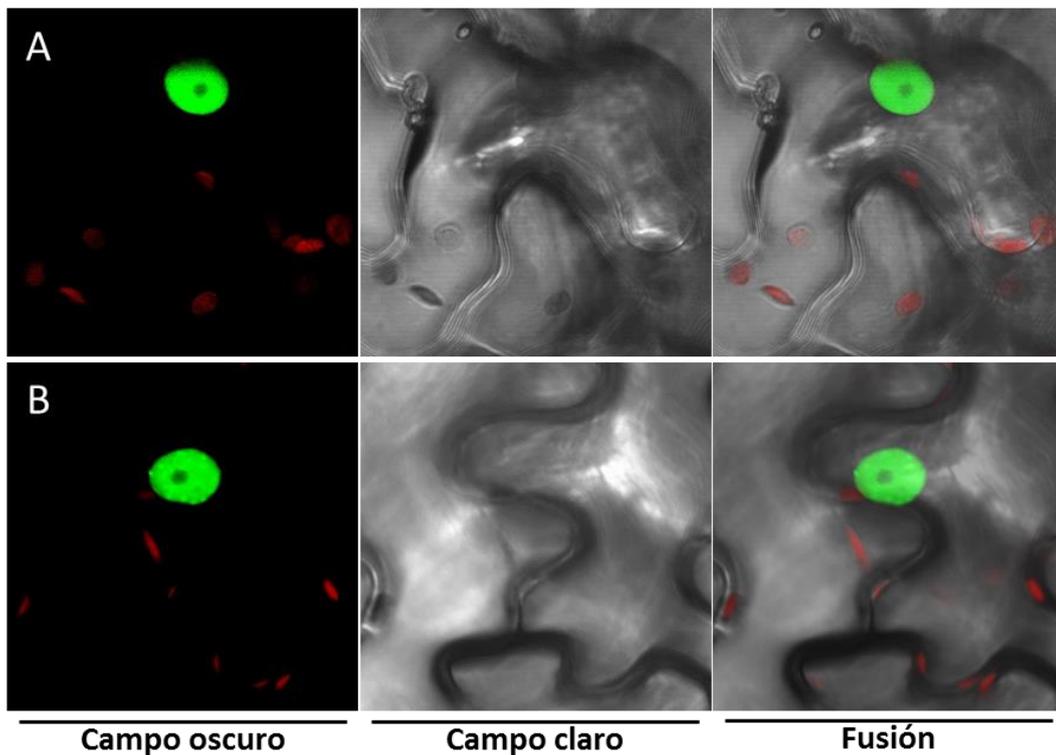


Figura 36. Localización subcelular de la proteína SIDOF10 en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Se muestran tres imágenes de un mismo plano para cada una de las construcciones

A. Hoja agroinfiltrada con la construcción 35S::YFP-SIDOF10.

B. Hoja agroinfiltrada con la construcción 35S::SIDOF10-YFP.

La coloración verde muestra la fluorescencia de la proteína YFP y la coloración roja muestra la autofluorescencia de la clorofila.

1.3 Silenciamiento transitorio de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31*

Con el fin de realizar una comparación detallada del efecto de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* sobre el desarrollo reproductivo de las plantas, se realizó un ensayo de silenciamiento génico transitorio, utilizando la tecnología denominada VIGS (*Virus-Induced Gen Silencing*). El silenciamiento se realizó utilizando vectores virales basados en TRV. Estos vectores han sido utilizados previamente para el silenciamiento transitorio postranscripcional de genes en tomate (Liu, 2002). Este sistema incluye dos plásmidos: pTRV1, el cual contiene el RNA1 del cDNA viral (replicación viral y movimiento) y pTRV2 que contiene el RNA2 del cDNA viral (proteína de la cáside) y el sitio en el que se inserta el fragmento génico de interés. En este experimento, se realizaron construcciones independientes para los genes *SIDOF10* y *SIDOF31*, utilizando un fragmento de 400 pb aproximadamente, correspondiente a la región 3', ya que es la región más específica para cada uno de los genes. Los fragmentos amplificados a partir de cDNA de flores, se insertaron en el vector viral modificado pTRV2, que incluye los sitios de recombinación attR1 y attR2 que permiten la ligación de secuencias de DNA utilizando la tecnología *Gateway* (Liu, 2002). Finalmente, la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens* se transformó con cada una de las construcciones por separado.

El experimento consistió en agroinfiltrar el envés de los cotiledones y las primeras hojas verdaderas de plántulas de 10 días de edad, con una suspensión mixta de los cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* C58 a partes iguales, que contenían por un lado el plásmido pTRV1 y por otro el plásmido pTRV2 con el fragmento del gen. En total se realizaron cinco ensayos, y se agroinfiltraron 10 plantas para cada uno de ellos. Las construcciones utilizadas se representan en la figura 10. Dos de los ensayos corresponden al silenciamiento de cada uno de los genes por separado y otro corresponde a la mezcla de las construcciones pTRV2-*SIDOF10* y pTRV2-*SIDOF31*, con el cual se buscaba silenciar simultáneamente ambos genes (Figura 37). Como control negativo del silenciamiento se utilizaron plantas agroinfiltradas únicamente con el plásmido pTRV1 y como control positivo se utilizó el plásmido pTRV2 llevando un fragmento del gen *PDS*. Este gen codifica una enzima clave en la biosíntesis de carotenoides, la fitoeno-desaturasa, y se sabe que el silenciamiento postranscripcional de este gen causa blanqueamiento en las plantas de tomate.

El fenotipo de las plantas *PDS-VIGS*, muestra que efectivamente se ha generado silenciamiento del gen, ya que se observa un blanqueamiento de las plantas a partir de las dos semanas posteriores a la agroinfiltración. El efecto del silenciamiento del gen *PDS* en estas plantas se detecta en las primeras inflorescencias, las flores y los frutos generados en ellas. Debido a lo anterior se decidió evaluar el desarrollo y la producción de las dos primeras inflorescencias de todas las plantas en los diferentes ensayos.

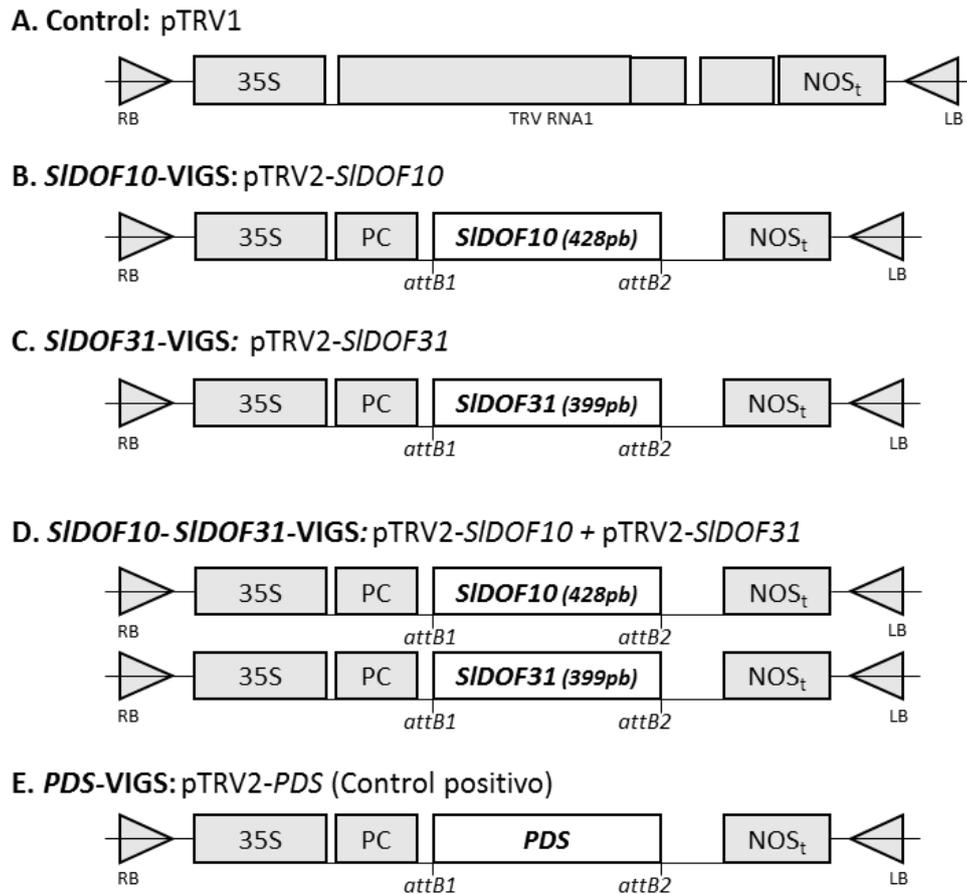


Figura 37. Esquema de las construcciones utilizadas en el ensayo del silenciamiento transitorio mediante la tecnología VIGS.

A. pTRV1, que contiene el cDNA viral completo del RNA1. Construcción utilizada para la complementación del virus en todos los tratamientos y como control negativo en ausencia del vector pTRV2.

B. pTRV2-SIDOF10, utilizada para el silenciamiento del gen *SIDOF10*.

C. pTRV2-SIDOF31, utilizada para el silenciamiento del gen *SIDOF31*.

D. pTRV2-SIDOF10 + pTRV2-SIDOF31. Mezcla de las construcciones B y C, para el silenciamiento simultáneo de los genes.

E. pTRV2-PDS. Construcción utilizada para el control interno de la infección viral.

35S, Promotor constitutivo del virus CaMV; RB, borde derecho; LB, borde izquierdo; NOS_t, Terminador NOS; PC, proteína de la Capside; attB1 y attB2 sitios de recombinación Gateway.

Las plantas agroinfiltradas se analizaron visualmente, registrando el número de hojas verdaderas hasta la primera inflorescencia. Las plantas silenciadas de los diferentes ensayos no presentan ninguna alteración morfológica a nivel vegetativo y los datos recolectados muestran que no existen cambios significativos en el número total de hojas respecto a las plantas control (pTRV1), en ninguno de los ensayos (Figura 38). Es decir, el silenciamiento transitorio de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* no afecta el tiempo de floración de las plantas.

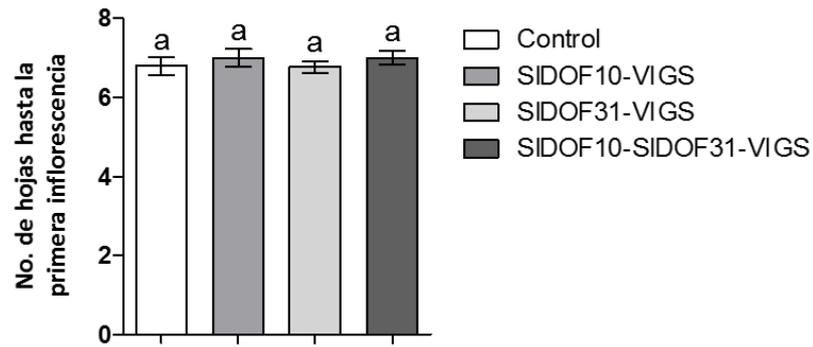


Figura 38. Evaluación del tiempo de floración de plantas en plantas silenciadas.

Los datos representan la media del número de hojas hasta la primera inflorescencia de 10 plantas por cada ensayo.

Las barras indican el error estándar de la media.

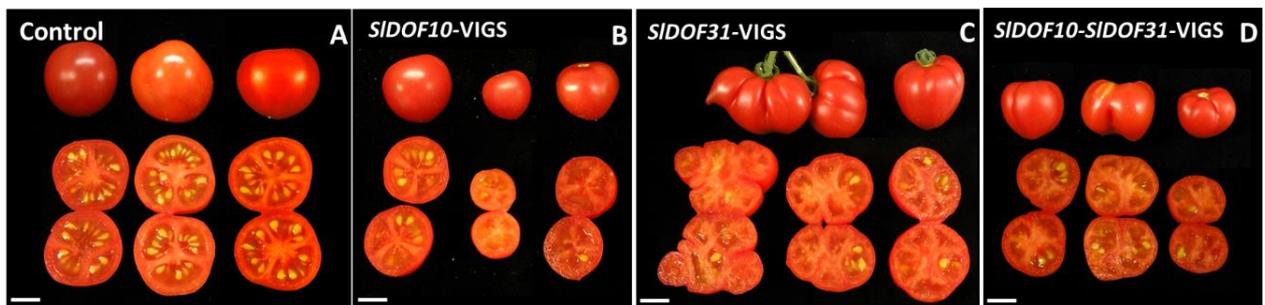


Figura 39. Fenotipo de los frutos en plantas silenciadas mediante tecnología VIGS

A. Frutos de plantas control (PTRV1)

B. Frutos de plantas *SIDOF10*-VIGS, silenciamiento postranscripcional del gen *SIDOF10*.

C. Frutos de plantas *SIDOF31*-VIGS, silenciamiento postranscripcional del gen *SIDOF31*.

D. Frutos de plantas *SIDOF10-SIDOF31*-VIGS, silenciamiento simultáneo de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31*.

A nivel reproductivo, se evaluaron las flores de las primeras inflorescencias de las plantas, y no se encontraron diferencias entre las flores de plantas control y las flores de plantas silenciadas. Por tanto, el silenciamiento de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* no altera de manera evidente la morfología de la flor.

En cuanto al desarrollo del fruto, las plantas *SIDOF10*-VIGS presentaron una disminución en el tamaño del fruto respecto a los de las plantas control (Figura 39). En las plantas *SIDOF10*-VIGS la morfología del fruto no se vio alterada (Figura 39 B), mientras que en las plantas *SIDOF31*-VIGS y plantas del silenciamiento simultáneo de los genes *SIDOF10-SIDOF31*-VIGS, se observaron frutos con deformaciones (Figura 39 C y D respectivamente).

Los frutos de las primeras inflorescencias para cada uno de los ensayos, fueron sometidos a un análisis detallado, en el cual se medían los siguientes parámetros físicos: peso, número de semillas/fruto, número de lóculos/fruto y presencia o ausencia de pseudoembriones.

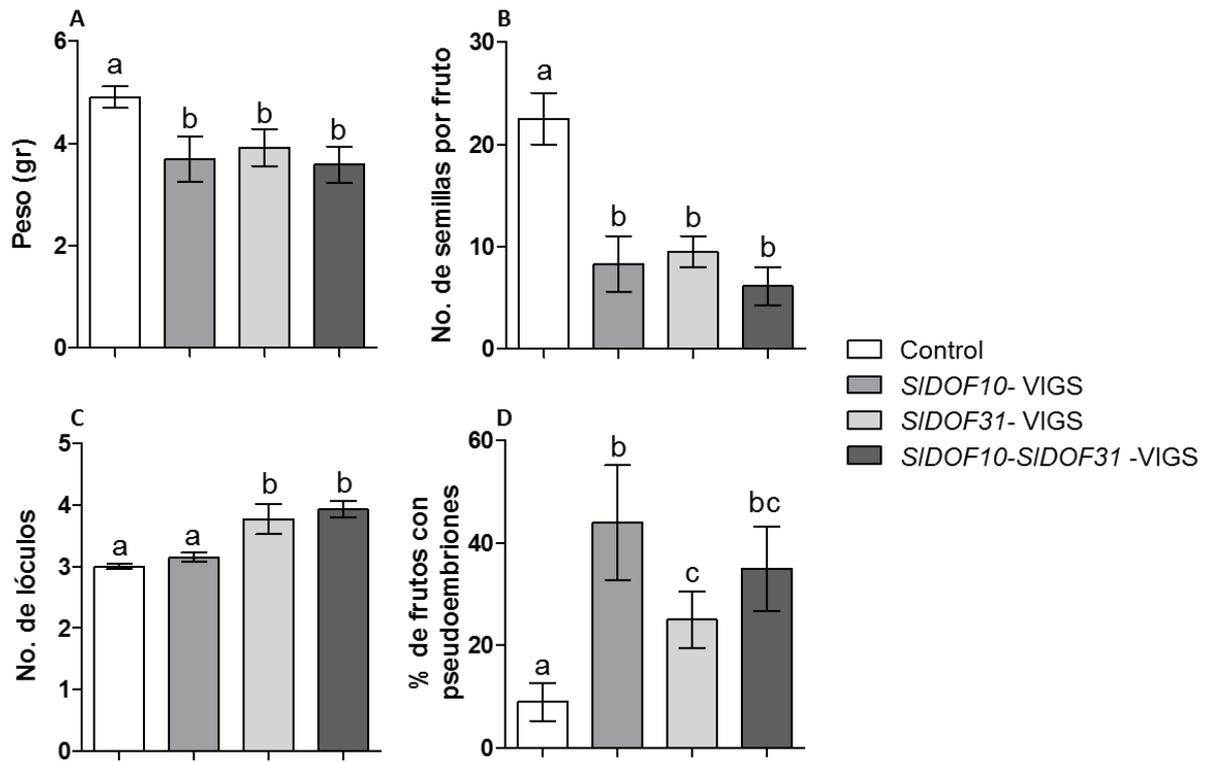


Figura 40. Características físicas de los frutos en plantas silenciadas *SIDOF10-VIGS*, *SIDOF31-VIGS* y *SIDOF10-SIDOF31-VIGS*.

- A. Peso de los frutos
- B. Número de semillas por fruto
- C. Número de lóculos
- D. Porcentaje de frutos con pseudoembriones

En los tres ensayos hubo una reducción significativa en el peso medio de los frutos respecto a los frutos de plantas control (Figura 40 A). Estos datos correlacionan con la disminución del tamaño del fruto en plantas *SIDOF10-VIGS* (Figura 39) y del número de semillas que es mayor del 50% en todos los casos (Figura 40 B). Al mismo tiempo, se evidenció que en los tres ensayos había un elevado porcentaje de frutos con presencia de pseudoembriones, respecto a las plantas control (Figura 40 C). No obstante, existen diferencias significativas entre las plantas *SIDOF31-VIGS* y las plantas *SIDOF10-VIGS*, en donde el porcentaje de frutos con pseudoembriones es mayor en plantas donde el gen *SIDOF10* está silenciado (Figura 40 C).

Por otra parte, en relación al número de lóculos de los frutos, se observó un aumento en plantas *SIDOF31-VIGS* (Figura 40 E). Seguramente esta debe ser la causa de las deformaciones del fruto observadas en las plantas *SIDOF31-VIGS* y *SIDOF10-SIDOF31-VIGS* (Figura 39 C y D).

En resumen, los resultados del silenciamiento transitorio de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31*, evidencian que ambos genes se requieren durante el desarrollo del ovario y la formación de las semillas. Sin embargo, sus funciones no son redundantes ya que el silenciamiento individual de estos genes afectan a diferentes aspectos del desarrollo del ovario.

1.4 Análisis de expresión de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31*

La expresión de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* se evaluó en diferentes estadios de desarrollo y órganos de la planta mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Para ello se diseñaron un par de oligonucleótidos para cada gen, que amplifican un fragmento de aproximadamente 50 pb. En ambos casos se eligió una región específica para cada gen. El análisis de expresión de los genes se llevó a cabo en plántulas de 7 días (separando el extremo apical, que contiene el meristemo apical del tallo y los cotiledones, del extremo basal o raíz), hojas jóvenes provenientes de plantas adultas y flores en diferentes estadios de desarrollo (desde 6 días antes de la antesis hasta la flor polinizada). Por otra parte, para analizar la expresión de estos genes en los órganos de la flor, se tomaron flores 2 días antes de antesis y se realizó una disección, separando los cuatro verticilos florales.

Los análisis muestran que el gen *SIDOF10* se expresa tanto en el meristemo apical como en las raíces de plántulas de siete días. En la planta adulta, se observa expresión en tejido vegetativo y en las flores en desarrollo. Durante el desarrollo de la flor el nivel más alto de expresión se detectó en las flores de 6 días antes de la antesis decreciendo drásticamente tras la antesis (Figura 41 A). Este patrón de expresión parece sugerir que la expresión de este gen es necesaria durante las etapas tempranas del desarrollo de la flor. En los verticilos florales el nivel más alto de expresión del gen se detecta en sépalos, seguida de estambres, carpelo y por último los pétalos (Figura 41 B). En general el transcrito del gen *SIDOF10* se detecta en todos los tejidos evaluados por lo que este gen parece requerirse en diferentes etapas del desarrollo a lo largo de toda la vida de la planta.

Por su parte el análisis de expresión del gen parálogo *SIDOF31* detecta el transcrito en la región apical del tallo, mientras que en las raíces es casi indetectable (Figura 41 C), a diferencia de lo observado para el gen *SIDOF10* que se expresa de manera similar en ambos tejidos. En planta adulta, se observa expresión del gen *SIDOF31* en hojas y en flores. El análisis a lo largo del desarrollo de la flor, muestra que los mayores niveles del transcrito del gen *SIDOF31* se presentan en flores 6 días antes de la antesis, al igual que el gen *SIDOF10*. Sin embargo, a diferencia del gen *SIDOF10*, la expresión del *SIDOF31* se mantiene constante en todas las etapas florales evaluadas, sugiriendo que este gen podría tener una función durante todo el desarrollo floral (Figura 41 C). El análisis de expresión a nivel de los cuatro verticilos florales, muestra que la mayor expresión se encuentra en pétalos y carpelo, seguidos por sépalos y estambres (Figura 41 D). Los resultados obtenidos indican que el gen *SIDOF31* se expresa en todos los tejidos evaluados excepto en las raíces de plántulas.

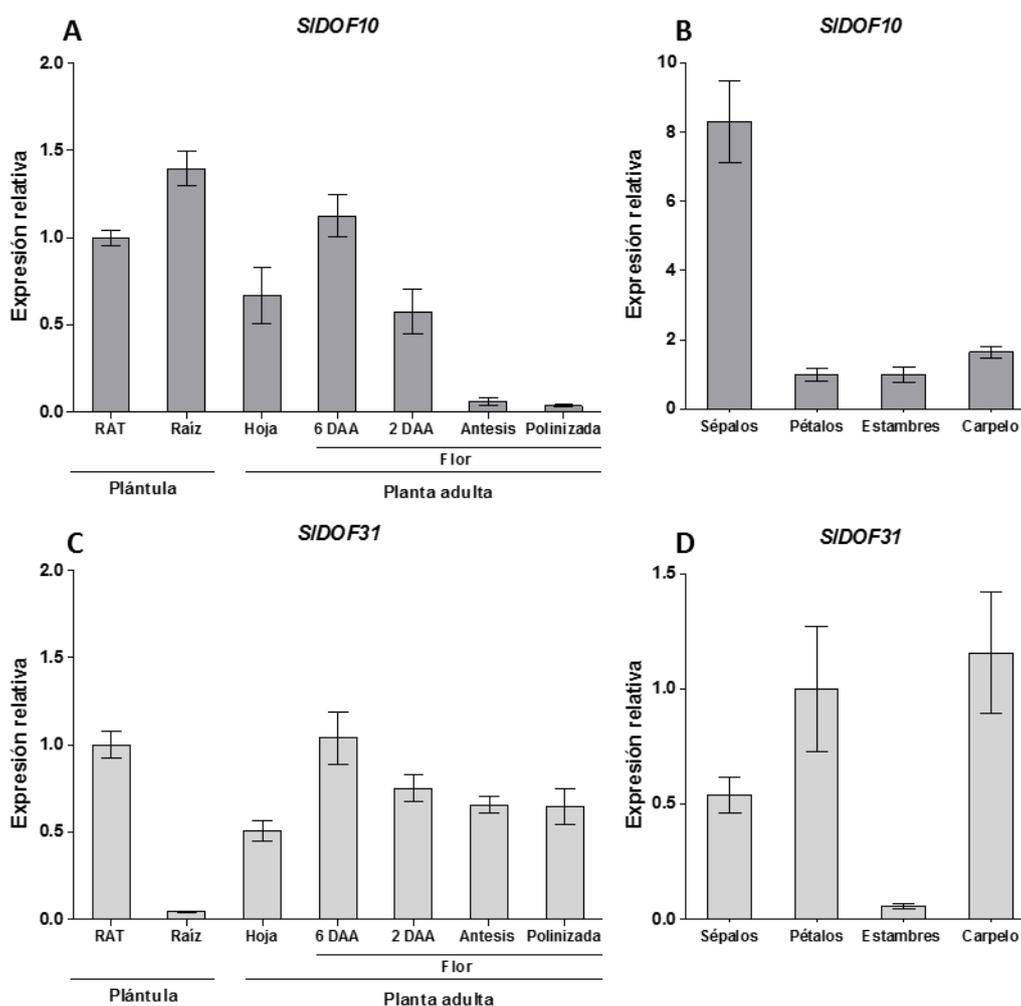


Figura 41. Expresión relativa de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* en diferentes tejidos de plantas silvestres de tomate cv. Micro-Tom.

A y B. Expresión relativa del gen *SIDOF10*.

D y C. Expresión relativa del gen *SIDOF31*.

A y C. Se muestra el nivel de los transcritos en la región apical del tallo (RAT) y raíz de plántulas con 7 días de edad, hojas de planta adulta, flores de seis y dos días antes de la antesis, en antesis y flor polinizada. Los niveles se hicieron relativos a la expresión en el meristemo de plántulas.

B y D. Nivel de expresión de los genes en los 4 verticilos florales relativo al nivel en pétalos.

El nivel de expresión génica se cuantificó mediante RT-qPCR, utilizando como gen endógeno normalizador *SIACT8*.

Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas.

1.5 Localización del transcrito de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31*

A fin de determinar el patrón de expresión tisular de los genes parálogos *SIDOF10* y *SIDOF31* en el ovario de plantas silvestres, se realizaron hibridaciones *in situ* utilizando sondas de RNA marcadas con digoxigenina. Las sondas se sintetizaron a partir de un fragmento de 428 pb para el gen *SIDOF10* y de 399 pb para el gen *SIDOF31*. Los fragmentos corresponden a la región 3' de los genes, debido a que ésta es la zona más específica para cada uno de ellos. Los fragmentos amplificados se clonaron en antisentido frente al promotor T7. La hibridación *in situ* se llevó a

cabo sobre secciones longitudinales de la flor, y en el caso del gen *SIDOF10* también se utilizaron secciones de meristemo apical.

La hibridación *in situ* muestra que el transcrito de *SIDOF10* está localizado en los haces vasculares de los tejidos evaluados, ovarios de tomate y meristemo apical (Figura 42). En particular dentro del ovario la señal se localiza sobre el tejido vascular y en la base de los óvulos en el cilindro vascular del funículo donde, en secciones transversales del mismo se observa la disposición circular de la expresión (Figura 42 C y D). El patrón de expresión de este gen sugiere que puede estar involucrado en el desarrollo del tejido vascular del ovario y participar en el desarrollo del óvulo.

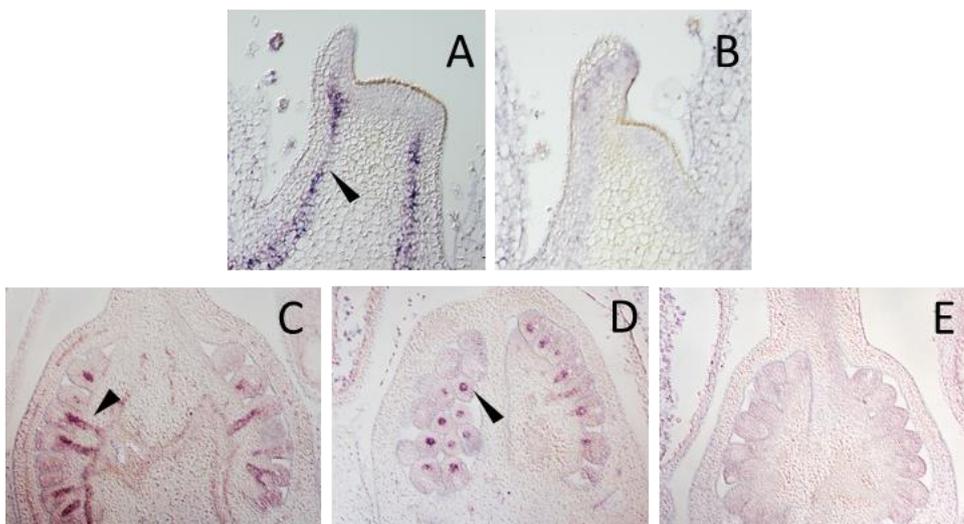


Figura 42. Localización del transcrito del gen *SIDOF10* mediante hibridación *in situ*.

A y B. Corte longitudinal de meristemo apical de plántulas de 7 días.

B. Control negativo de hibridación en el meristemo apical.

C-E. Cortes longitudinales de ovarios de tomate cv. Micro-Tom no polinizados (2DAA).

E. Control negativo de la hibridación en ovarios.

Las flechas señalan la expresión de *SIDOF10* en los haces vasculares de los tejidos evaluados.

El transcrito del gen *SIDOF31* también se localiza en el ovario de flores no polinizadas, pero a diferencia de *SIDOF10* la expresión no se encuentra en los haces vasculares del ovario. Específicamente la señal se detecta en el estilo de las flores, desde etapas muy tempranas de desarrollo (6 DAA), hasta las etapas próximas a la antesis (2DAA) (Figura 43 A y C). Al mismo tiempo, se observa señal en el óvulo, concretamente en la zona del integumento externo próxima al micrópilo (Figura 43 D y E). Los resultados del análisis indican que el gen *SIDOF31* podría estar contribuyendo en desarrollo del pistilo y en la formación del óvulo.

La localización de los transcritos de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31*, sugieren que estos dos genes podrían estar desempeñando un papel importante en la etapa reproductiva, especialmente en la formación del ovario y el desarrollo del óvulo. Sin embargo, el hecho de que la localización de los

transcritos dentro del mismo tejido sea tan distinta, hace pensar que los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* posiblemente estén actuando en rutas diferentes y que nos son funcionalmente redundantes.

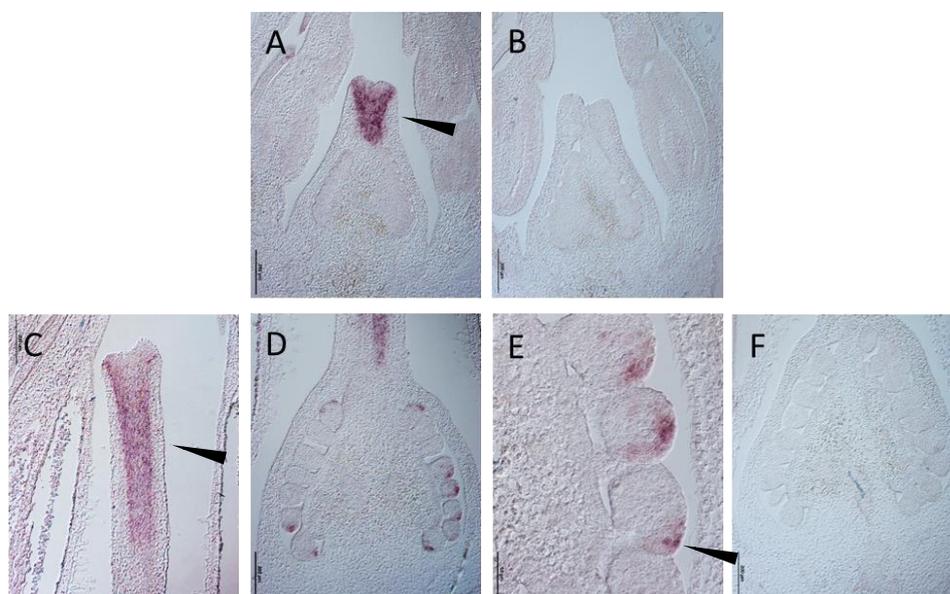


Figura 43. Localización del transcrito del gen *SIDOF31* mediante hibridación *in situ*.

A y B. Corte longitudinal de ovarios 6 días antes de la antesis (DAA).

B. Control negativo de hibridación.

C y F Cortes longitudinales de ovarios de tomate cv. Micro-Tom no polinizados 2DAA.

E. Detalle de los óvulos en ovarios no polinizados.

F. Control negativo de la hibridación

Las flechas señalan la expresión de *SIDOF31* en pistilo y el integumento externo de los óvulos.

1.6 Análisis del patrón de expresión del gen *SIDOF10* mediante la línea reportera *pSIDOF10:GUS*.

A fin de realizar un análisis más detallado acerca de la localización espacio-temporal de la expresión del gen *SIDOF10*, se generaron plantas transgénicas estables en las que el promotor del gen *SIDOF10* controla la expresión del gen reportero *GUS*. Para esto se amplificó mediante PCR un fragmento de 2463 pb de la región promotora del gen (región 5' aguas arriba del gen), usando como molde DNA genómico extraído de hojas jóvenes de plantas silvestre de tomate (cv. Micro-Tom). El fragmento se insertó por recombinación en el vector binario pKGWFS7,0, que contiene el gen reportero, codificante de la enzima β -glucuronidase de *E. coli*, dando lugar a la construcción *pSIDOF10:GUS* (Figura 44). Esta construcción se utilizó para generar plantas transgénicas de tomate (var. Micro-Tom), siguiendo la metodología descrita por Ellul y colaboradores (2003) con algunas modificaciones (ver Materiales y Métodos). Tras la regeneración *in vitro* de los transformantes primarios resistentes a Kanamicina, las plantas obtenidas se sometieron al análisis de ploidía mediante citometría de flujo. En total de 150 explantes de partida, se obtuvieron dos plantas transgénicas diploides, las cuales han sido utilizadas para el estudio de la localización de expresión del gen *SIDOF10*.

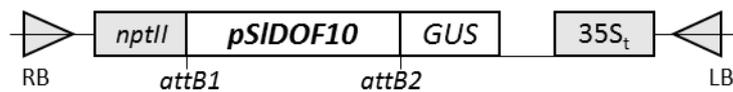


Figura 44. Representación de la construcción *pSIDOF10:GUS*, utilizada para estudiar la localización espacio-temporal de expresión del gen *SIDOF10*.

El rectángulo verde representa la región promotora del gen *SIDOF10* de 2491 pb; el rectángulo azul representa el gen reportero *GUS*.

RB, borde derecho; LB, borde izquierdo; 35S_t, Terminador 35S; *attB1* y *attB2* sitios de recombinación Gateway.

En las plantas transgénicas de tomate *pSIDOF10:GUS* la señal del GUS se detecta en el tejido vascular a lo largo de todo el desarrollo de la planta. En plántulas se observa señal en los haces vasculares de cotiledones y hojas verdaderas, también se observa expresión en la región apical del hipocótilo y en raíces, en donde se detecta una acumulación en el meristemo apical de la raíz primaria y en los sitios donde se van a originar las raíces laterales (Figura 45).

Durante el desarrollo floral la expresión del GUS se detecta en los haces vasculares en sépalos. Especialmente se observa una acumulación de la señal en la base de la flor, que corresponde al receptáculo (Figura 45 F). Al realizar cortes longitudinales de las flores, pudimos observar que el promotor del gen *SIDOF10* dirige la expresión del gen reportero a la base de óvulos en todas las etapas evaluadas (desde 6 DAA hasta la flor polinizada) (Figura 45 G). Sin embargo, cuando el ovario está polinizado la señal también se incrementa en la columnela del ovario (Figura 45 G).

Con el fin de analizar a qué grupo celular dirige la expresión del gen el promotor *pSIDOF10*, se realizaron cortes transversales del pedicelo. La organización vascular en tomate es en forma de anillo y está compuesta por haces de tipo bi-colateral, en este tipo de organización el xilema se desarrolla en paralelo con el floema interno y el externo (Caño-Delgado *et al.* 2010). En el corte transversal del pedicelo de la flor se puede ver que la expresión se encuentra en cada grupo celular que compone el anillo vascular, en las células del floema interno, el floema externo, el xilema y en el cambium vascular (Figura 45 H). Este último grupo corresponde a las células meristemáticas que van a dar lugar al xilema y al floema. A nivel de fruto, se observa como la expresión de GUS se encuentra en los haces vasculares de la columnela y esta señal llega hasta el funículo de la semilla (Figura 45 J).

Todos estos resultados sugieren que el gen *SIDOF10*, podría estar involucrado en el desarrollo vascular de la planta a lo largo de su ciclo de vida.

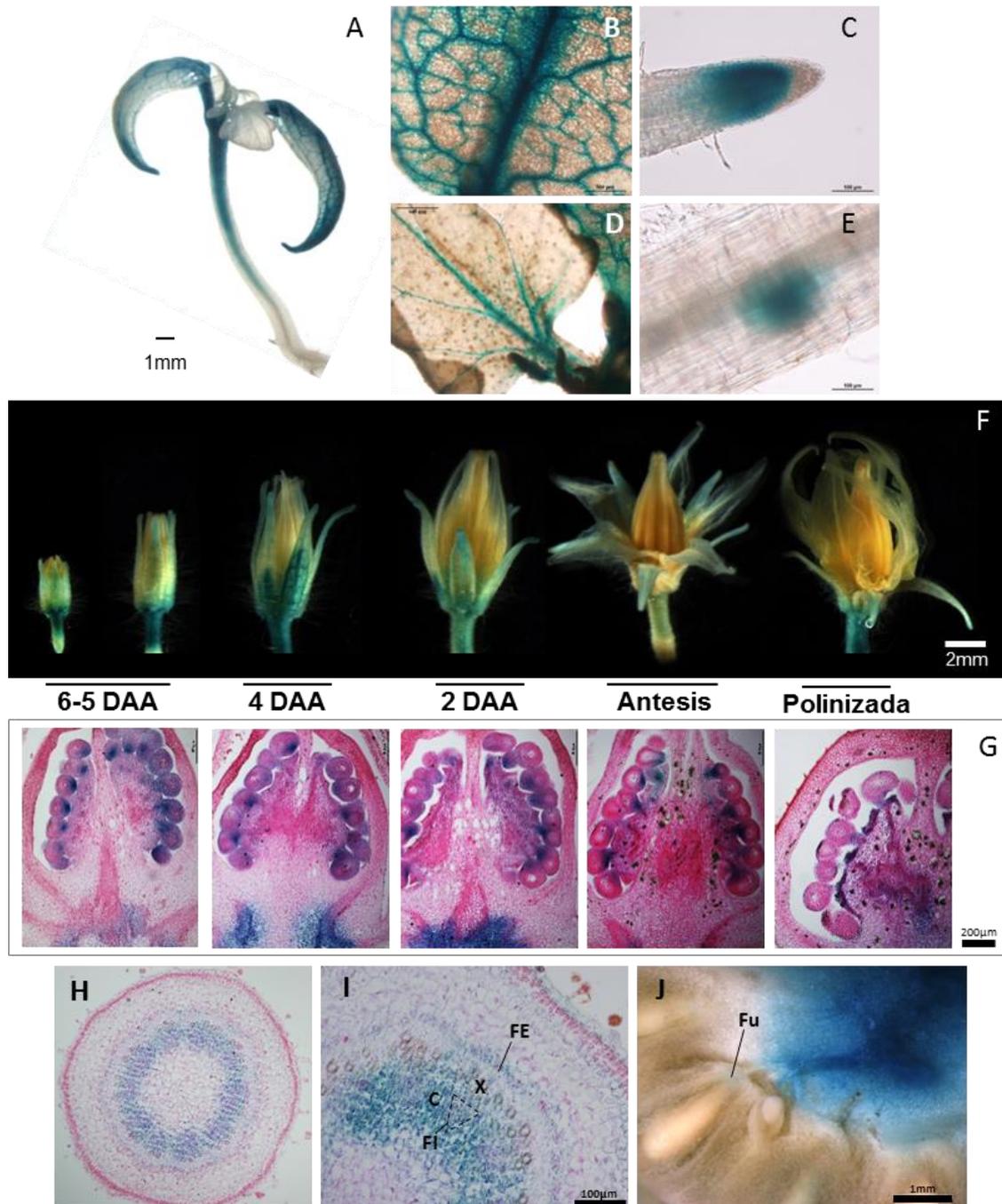


Figura 45. Patrón de expresión de *pSIDOF10::GUS* en plantas de tomate. Detección histoquímica de la actividad GUS dirigida por el promotor del gen *SIDOF10*. La señal se detecta en el tejido vascular de la planta.

A. Plántula de línea transgénica *pSIDOF10::GUS* de 10 días de edad.

B. Detalle de cotiledón de la plántula.

C. Detalle de hojas verdaderas de la plántula.

D. Zona apical de la raíz principal de plántulas *pSIDOF10::GUS*.

E. Zona de formación de una raíz secundaria en plántulas *pSIDOF10::GUS*.

F. Detección de la señal GUS durante el desarrollo de la Flor desde 6 Días Antes de Antesis (DAA) hasta la flor polinizada.

G. Cortes longitudinales de flores en las distintas etapas de desarrollo.

H-I. Corte transversal del pedicelo de la flor 2DAA. Se señalan el floema externo (FE), floema interno (FI), Xilema (X) y el Cambium vascular (C).

J. Detalle corte transversal de un fruto, se señala la expresión en el funículo de la semilla (Fu).

1.7 Actividad del promotor *pSIDOF10* en el sistema heterólogo *Arabidopsis thaliana*

Con el fin de evaluar la utilidad del promotor *pSIDOF10* para dirigir la expresión de genes de interés a tejido vascular en sistemas heterólogos, hemos utilizado la especie vegetal *Arabidopsis thaliana*. Para ello transformamos plantas de *Arabidopsis* con la construcción *pSIDOF10::GUS* (Figura 44), vía *Agrobacterium tumefaciens*. Tras la obtención de líneas homocigotas, se evaluó la actividad GUS bajo el control del promotor *SIDOF10* en diferentes estadios de desarrollo de la planta.

A nivel de plántulas la señal de GUS se detectó en los haces vasculares de cotiledones y hojas verdaderas, pero a diferencia de las plantas de tomate no se observó expresión en el hipocotilo (Figura 46 A). Al mismo tiempo, en las raíces de las plántulas la expresión se localizó en el extremo apical y en el sitio donde se va a formar una nueva raíz secundaria (Figura 46 B y C).

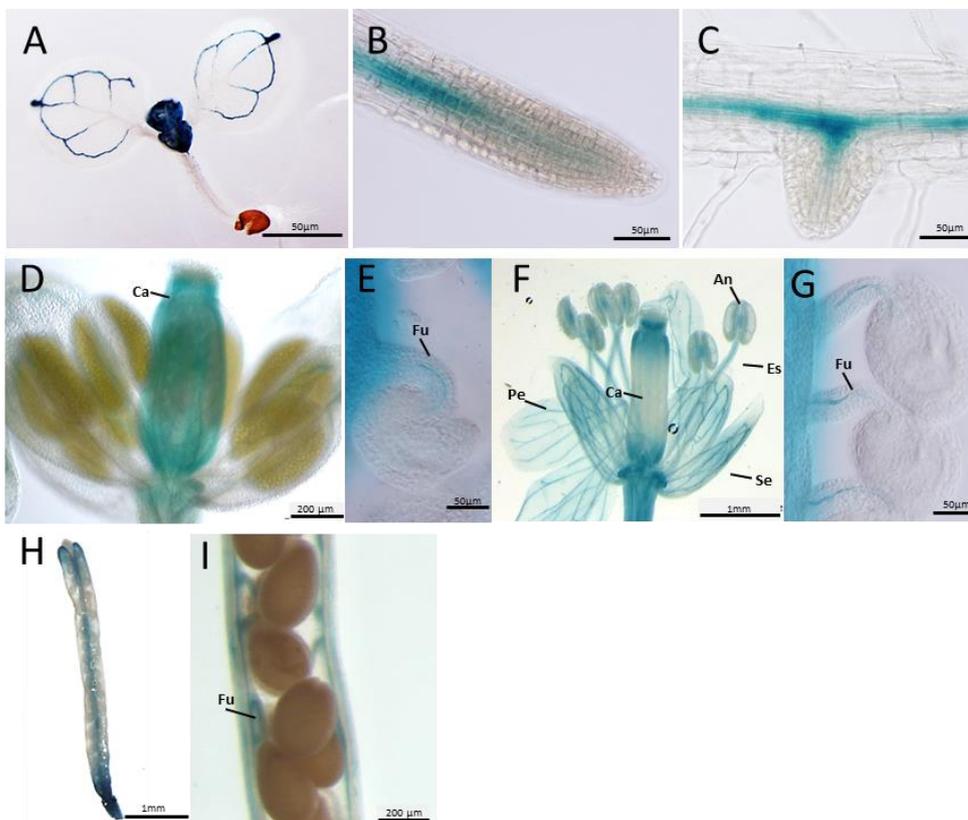


Figura 46. Patrón de expresión de *pSIDOF10::GUS* en plantas de *Arabidopsis*. Detección histoquímica de la actividad GUS dirigida por el promotor *SIDOF10*. La señal se detecta en el tejido vascular de la planta.

- A. Plántula de *Arabidopsis*.
 - B. Zona apical de la raíz principal de plántulas *pSIDOF10::GUS* de *Arabidopsis*.
 - C. Zona de formación de una raíz secundaria en plántulas *pSIDOF10::GUS* de *Arabidopsis*.
 - D. Flor no polinizada
 - E. Óvulo de flor no polinizada
 - F. Flor polinizada
 - G. Detalle de óvulo de flor polinizada
 - H. Silicua
 - I. Detalle de semillas
- Ca, carpelo; Fu, funículo; Se, sépalos; Pe, pétalos; Es, estambres; An, antera.

La actividad GUS se evaluó en diferentes estadios del desarrollo floral antes y después de la polinización. En flores no polinizadas la señal se detecta en las paredes del carpelo (Figura 46 D). En flores polinizadas la expresión se localiza en el tejido vascular de sépalos, pétalos, estambres y carpelo (Figura 46 F). Específicamente en las paredes del carpelo se observa como la señal se acumula en los dos extremos (apical y basal) (Figura 46 F). En la silicua la expresión se encuentra en los haces vasculares y se detecta nuevamente la acumulación de señal en los dos extremos de la silicua (Figura 46 H). En el análisis detallado del óvulo antes y después de la polinización la expresión del gen se detecta en los haces vasculares del funículo (Figura 46 E y G) y este mismo patrón se observa en el funículo de la semilla (Figura 46 I).

Nuestros resultados de expresión de *pSIDOF10:GUS* en el sistema heterólogo *Arabidopsis thaliana*, indica que la secuencia promotora del gen *SIDOF10* que hemos utilizado, dirige la expresión del gen hacia los haces vasculares de la planta durante todo su desarrollo, manteniendo un patrón de expresión similar al que se encontró en tomate.

1.8 Detección de secuencias consenso de elementos reguladores en *cis* presentes en la región promotora del gen *SIDOF10*

Con el fin de detectar elementos de regulación de la expresión del gen *SIDOF10*, se realizó un análisis de la región promotora del gen (secuencia de 2463 pb utilizada en la construcción *pSIDOF10:GUS*) mediante la utilización de las bases de datos de los programas PlantCARE (Lescot *et al.* 2002) y PLACE (Higo *et al.* 1999). Estos programas poseen una colección de elementos reguladores de genes de plantas reportados en la literatura.

En la secuencia promotora analizada hemos detectado secuencias consenso de elementos de regulación en *cis*, que están involucrados en diferentes procesos (Tabla 16). Entre estas secuencias destaca la presencia de numerosos elementos de regulación en respuesta a luz, para la cual se encontraron al menos 20 secuencias consenso distintas (Tabla 16). Así mismo se encontraron motivos de regulación por estrés biótico y abiótico. Dentro del análisis también se identificaron cuatro elementos de regulación específica de tejido, uno de raíz y dos de endospermo. La presencia de elementos de regulación específica de raíz, concuerdan con el hecho de que la expresión del gen *SIDOF10* se encuentra en las raíces de la planta. Al mismo tiempo los dos motivos de regulación específica del endospermo, son coherentes con la posible función del gen *SIDOF10* en el desarrollo de la semilla.

Nombre del motivo	Organismo	Número de repeticiones*	Secuencia	Función
TATA-box	<i>Lycopersicon esculentum</i> (<i>Solanum lycopersicum</i>)	20	TTTTA	Proceso de transcripción por la RNA polimerasa.
TCT-motif	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	TCTTAC	Elemento de respuesta a luz
Sp1	<i>Zea mays</i>	1	CC(G/A)CCC	Elemento de respuesta a luz
LAMP-element	<i>Spinacia oleracea</i>	1	CCAAAACCA	Elemento de respuesta a luz
I-box	<i>Zea mays</i>	1	cGATAAGGCG	Elemento de respuesta a luz
GT1-motif	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	GGTTAA	Elemento de respuesta a luz
GAG-motif	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	AGAGAGT	Elemento de respuesta a luz
GA-motif	<i>Helianthus annuus</i>	1	AAAGATGA	Elemento de respuesta a luz
G-box	<i>Daucus carota</i>	1	TACGTG	Elemento de respuesta a luz
G-box	<i>Zea mays</i>	1	CACGTT	Elemento de respuesta a luz
G-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	CACGTG	Elemento de respuesta a luz
G-box	<i>Brassica napus</i>	1	ACACGTGT	Elemento de respuesta a luz
G-box	<i>Zea mays</i>	1	CACGTT	Elemento de respuesta a luz
G-Box	<i>Antirrhinum majus</i>	1	CACGTA	Elemento de respuesta a luz
G-Box	<i>Pisum sativum</i>	1	CACGTT	Elemento de respuesta a luz
G-Box	<i>Pisum sativum</i>	1	CACGTG	Elemento de respuesta a luz
G-Box	<i>Pisum sativum</i>	1	CACGTT	Elemento de respuesta a luz
Box I	<i>Pisum sativum</i>	3	TTTCAA	Elemento de respuesta a luz
Box 4	<i>Petroselinum crispum</i>	3	ATTAAT	Elemento de respuesta a luz
AE-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	AGAAACAT	Elemento de respuesta a luz
ACE	<i>Petroselinum crispum</i>	2	AAAACGTTTA	Elemento de respuesta a luz
ATCT-motif	<i>Pisum sativum</i>	1	AATCTAATCC	Elemento de respuesta a luz
Circadiano	<i>Lycopersicon esculentum</i> (<i>Solanum lycopersicum</i>)	1	CAANNNNATC	involucrado en el control circadiano
ABRE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	CACGTG	Respuesta a ácido abscísico
ABRE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	TACGTG	Respuesta a ácido abscísico
TCA-element	<i>Nicotiana tabacum</i>	1	CCATCTTTTT	Respuesta a ácido salicílico
TGACG-motif	<i>Hordeum vulgare</i>	4	TGACG	Respuesta a Metil-Jasmonato (MeJA)
NGATT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	30	NGATT	Elementos de respuesta a citoquininas
AuxRR-core	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Glycine max</i>	3	GGTCCAT / TGTCTC / CATATG	Elementos de respuesta a auxinas
GAREs	<i>Hordeum vulgare</i> / <i>Arabidopsis</i>	2	CCTTTT/TAACAA	Expresión en semilla regulada por GAS
AACA_motif	<i>Oryza sativa</i>	1	TAACAACTCCA	Elemento regulador negativo específico de endospermo (supresor en otros tejidos diferentes al endospermo)
Skn-1_motif	<i>Oryza sativa</i>	1	GTCAT	Expresión en el endospermo
AT-rich element	<i>Glycine max</i>	1	ATAGAAATCAA	Sitio de unión al DNA (rico en AT) de la proteína ATBP-1
MBS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	TAACTG	Sitio de unión de proteínas MYB, inducen expresión en respuesta a sequía
Raíz	<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Oriza sativa</i>	1	KCACGW	Elemento regulador específico de raíz
LTR	<i>Hordeum vulgare</i>	1	CCGAAA	Respuesta a bajas temperaturas
TC-rich repeats	<i>Nicotiana tabacum</i>	2	ATTTTCTTCA/GTTTTCTTAC	Respuesta a estrés

Tabla 16. Elementos de regulación en *Cis* presentes en la secuencia promotora del gen *SIDOF10*

Se muestran los motivos consenso encontrados a través de las bases de datos de los programas PlantCARE y PLACE.

* Número de repeticiones de la secuencia en la región promotora del gen *SIDOF10*

Por otra parte, se detectaron elementos de regulación en respuesta a fitohormonas. En particular, se encontraron al menos 30 elementos de regulación por citoquininas, dos por ácido abscísico,

uno por ácido salicílico, uno por ácido jasmónico, dos para giberelinas y dos elementos de regulación por auxinas (Tabla 16). Estos resultados sugieren que la expresión del gen *SIDOF10* podría estar regulada hormonalmente.

Nosotros hemos puesto especial atención a los sitios de regulación por auxinas, debido a que existen numerosas evidencias que sustentan que estas hormonas están implicadas en el cuajado y desarrollo del fruto, así como en el desarrollo del tejido vascular. Por esta razón, se decidió evaluar si la expresión del gen *SIDOF10* se inducía en presencia de auxinas. El experimento consistió en la aplicación de Ácido Indol Acético (IAA por sus siglas en inglés) en ovarios no polinizados, tal y como se describió en el apartado 1.3.2 de materiales y métodos. Dos días después del tratamiento los ovarios se recolectaron y se midió la expresión del gen *SIDOF10* mediante RT-qPCR.

Los análisis de expresión del gen *SIDOF10* muestran un aumento de hasta tres veces en los niveles del transcrito tras la aplicación de auxinas, comparando con los ovarios tratados con la solución control (Figura 47). Este resultado indica que posiblemente la expresión del gen *SIDOF10* se regule por la presencia de auxinas durante el desarrollo de la planta.

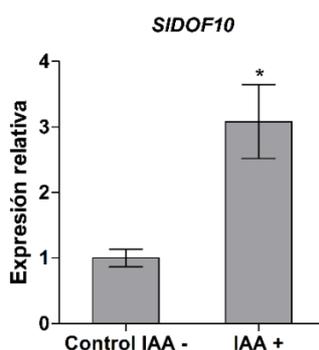


Figura 47. Expresión relativa del gen *SIDOF10* en ovarios tratados con auxinas.

La expresión es relativa al nivel del transcrito en ovarios tratados con la solución control sin auxinas (Control IAA-). El nivel de expresión génica se cuantificó mediante RT-qPCR, utilizando como gen endógeno normalizador *SIACT8*. Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas

2 ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *SIDOF10*

Para analizar la función de *SIDOF10* se generaron plantas transgénicas de tomate con niveles modificados de este gen. En concreto se pretendía estudiar el efecto que ocasiona en el desarrollo la ganancia de función en líneas de sobre-expresión y la de pérdida de función obtenida mediante silenciamiento estable (RNA de interferencia o RNAi).

En primer lugar, para la sobre-expresión del gen *SIDOF10* se amplificó por PCR un fragmento de 783 pb que corresponde al cDNA completo del gen. Para ello se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos que amplificaban la secuencia desde el ATG hasta el codón de parada

y como molde en la PCR se utilizó cDNA de ovarios de tomate (cv. Micro-Tom). El cDNA completo se insertó mediante recombinación en el vector de destino pK2GW7 que lo sitúa bajo el control del promotor constitutivo 35S dando lugar a la construcción *35S::SIDOF10* (Figura 48 A). Por otra parte, para generar la construcción de silenciamiento se diseñaron un par de oligos que amplificaban un fragmento de 428 pb correspondiente a la región 3' de la secuencia codificante del gen. Dicho fragmento se eligió debido a que no contiene la secuencia del dominio DOF y es específico del gen candidato. En este caso el fragmento se recombinó en el vector de silenciamiento pK7GWIWG2(I), que contiene el promotor constitutivo 35S y dos sitios de clonaje Gateway invertidos y separados por un intrón. Así, el fragmento del cDNA de *SIDOF10* se clonó en el vector pB7GWIWG2(I), dos veces, en forma directa e invertida, separadas por el intrón generando la construcción *RNAi::SIDOF10* (Figura 48 B).

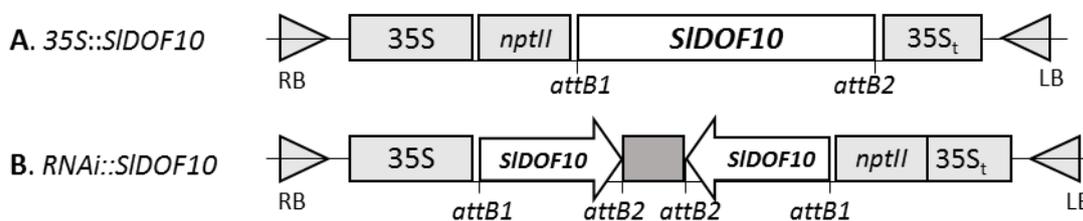


Figura 48. Esquema de las construcciones generadas para el análisis funcional del gen *SIDOF10*.

A. Construcción utilizada para sobre-expresión (*35S::SIDOF10*).

B. Construcción utilizada para el silenciamiento (*RNAi::SIDOF10*).

Ambas construcciones contienen el promotor constitutivo CaMV35S y el gen *nptII* que confiere resistencia a Kanamicina en plantas. *attB1* y *attB2* son los sitios de recombinación Gateway.

Las construcciones *35S::SIDOF10* y *RNAi::SIDOF10* se utilizaron para transformar genéticamente plantas de tomate de la variedad Micro-Tom. Se utilizó la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* y como material vegetal explantes de cotiledones. La metodología utilizada fue la descrita por Ellul y colaboradores (2003) con algunas modificaciones (ver Materiales y Métodos). Durante el proceso de transformación se obtuvieron también explantes regenerados mediante cultivo *in vitro* sin inocular con *A. tumefaciens*. Estas plantas, no transgénicas, son los testigos externos (TE) de la transformación y se utilizan como control en posteriores análisis.

El protocolo utilizado para la transformación permitió obtener 4 brotes transgénicos primarios T1 para la construcción de sobre-expresión *35S::SIDOF10* y 17 brotes transgénicos para la construcción de silenciamiento *RNAi::SIDOF10*.

2.1 Caracterización de plantas transgénicas

Las plantas transgénicas T1 obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo, a fin de evaluar el nivel de ploidía. De las 21 plantas obtenidas, 4 plantas resultaron ser tetraploides (4n): una

línea correspondía a la sobre-expresión del gen (25% de las líneas obtenidas) y las tres restantes a líneas de silenciamiento (17,6% de las líneas obtenidas). Los genotipos tetraploides se eliminaron y no se tuvieron en cuenta para los análisis posteriores.

Para corroborar la presencia del T-DNA, se evaluó la presencia del gen *nptII*, que confiere resistencia a Kanamicina. Para ello se realizó una PCR a partir de DNA genómico aislado de hojas jóvenes de plantas transgénicas diploides y usando oligonucleótidos específicos para este gen. En todas las líneas se detectó la presencia de un fragmento de 583 pb correspondiente al gen de selección.

2.1.1 Niveles de expresión de plantas transgénicas T1

El nivel de expresión del gen *SIDOF10* en las líneas transgénicas T1 de sobre-expresión y de silenciamiento se evaluó mediante RT-qPCR. Se utilizó RNA de hojas jóvenes de cada una de las líneas transgénicas diploides obtenidas y como gen normalizador el gen endógeno *ACTINA8* (*SIACT8*).

Los resultados mostraron que las plantas transgénicas llevando la construcción *35S::SIDOF10*, presentan un nivel de expresión del gen entre 2 y 5 veces por encima del nivel normal. El mayor incremento se detecta en la línea *35S::SIDOF10* L16, seguida de las líneas *35S::SIDOF10* L22 y L13 (Figura 49). Lo que indica que efectivamente el gen en estudio está sobre-expresado en las plantas transgénicas.

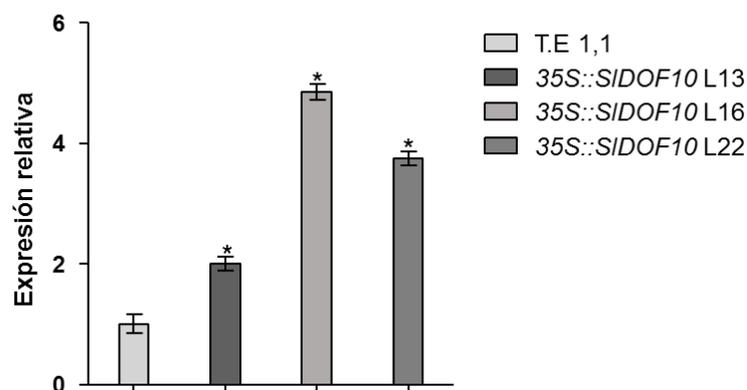


Figura 49. Expresión relativa de *SIDOF10* en líneas transgénicas *35S::SIDOF10*.

Se muestran los niveles de expresión génica en plantas T1 de sobreexpresión *35S::SIDOF10*, relativos a los niveles de expresión en la planta control (TE 1.1).

El nivel de expresión génica se cuantificó mediante RT-qPCR, utilizando como gen endógeno normalizador *SIACT8*.

Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas. El asterisco indica diferencias significativas de entre las líneas transgénicas y el testigo ($p < 0,05$).

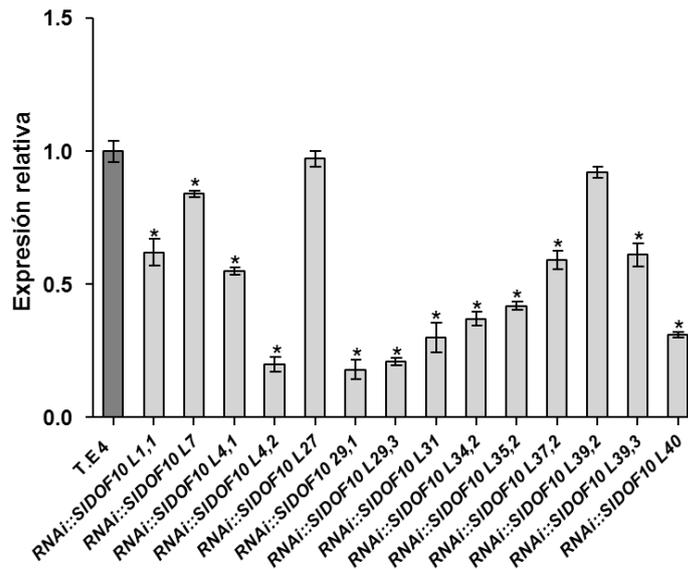


Figura 50. Expresión relativa de *SIDOF10* en líneas transgénicas *RNAi::SIDOF10*.

Se muestran los niveles de expresión génica en plantas T1 de silenciamiento *RNAi::SIDOF10*, relativos a los niveles de expresión en la planta control (TE).

El nivel de expresión génica se cuantificó mediante RT-qPCR, utilizando como gen endógeno normalizador *SIACT8*.

Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas de entre las líneas transgénicas y el testigo ($p < 0,05$).

Por otra parte, en las 14 líneas de silenciamiento *RNAi::SIDOF10* obtenidas, el nivel del transcrito es menor que en la planta testigo (Figura 50), lo cual revela que el abordaje por RNA de interferencia ocasiona el silenciamiento del gen *SIDOF10*. En las líneas *RNAi::SIDOF10* 4.2, 29.3 y 29.1 la reducción en la expresión es aproximadamente del 80% respecto a los niveles normales de transcrito. La mayor parte de las líneas muestran una disminución entre el 40-60 % (Figura 50). En este trabajo solo se tuvieron en cuenta para posteriores análisis, las líneas transgénicas que presentaban niveles de expresión por debajo del 40 %.

2.1.2 Análisis de segregación

El análisis de segregación de las líneas transgénicas obtenidas se realizó utilizando la progenie obtenida por la autopolinización (T2). Las semillas germinaron en medio suplementado con Kanamicina y únicamente las líneas que exhibieron una segregación 3:1 (resistente: sensible) se utilizaron para análisis posteriores, ya que esta proporción indica que las plantas presentan la inserción de una sola copia del T-DNA.

Para la obtención de las líneas homocigotas se utilizó la siguiente generación (T3). Las semillas nuevamente germinaron en medio suplementado con Kanamicina, pero en esta ocasión únicamente se eligieron las líneas en las cuales hubiese una resistencia del 100%. De las tres líneas transgénicas de sobre-expresión se obtuvieron plantas homocigotas de la línea L16

(*35S::SIDOF10* L16). Mientras que de 12 líneas silenciadas se obtuvieron plantas homocigotas para 5 de las líneas. Hemos elegido evaluar las líneas L29 y L31, las cuales presentan niveles de silenciamiento alrededor del 60% (*RNAi::SIDOF10* L29 y L31).

2.1.3 Nivel de expresión del gen *SIDOF10* en las líneas transgénicas homocigotas

El nivel de expresión del gen *SIDOF10* en las líneas transgénicas homocigotas de sobre-expresión y de silenciamiento se evaluó mediante RT-qPCR. Se utilizó RNA de flores (2DAA), y como gen normalizador nuevamente el gen endógeno *ACTINA8* (*SIACT8*).

Los resultados mostraron que la línea transgénica L16 que lleva la construcción *35S::SIDOF10*, presenta unos niveles de expresión de 2,3 veces por encima del valor normal, lo que indica que efectivamente el gen en estudio está sobreexpresado en las flores de estas plantas (Figura 51). Por otra parte, en las dos líneas de silenciamiento elegidas (*RNAi::SIDOF10* L29 y L31), el nivel del transcrito es menor que en las plantas silvestres, disminuyendo la expresión en un 80% aproximadamente para la línea *RNAi::SIDOF10* L29 y 60% para la línea *RNAi::SIDOF10* L31 (Figura 51). Las plantas transgénicas obtenidas han sido objeto de estudio para la caracterización funcional del gen *SIDOF10*.

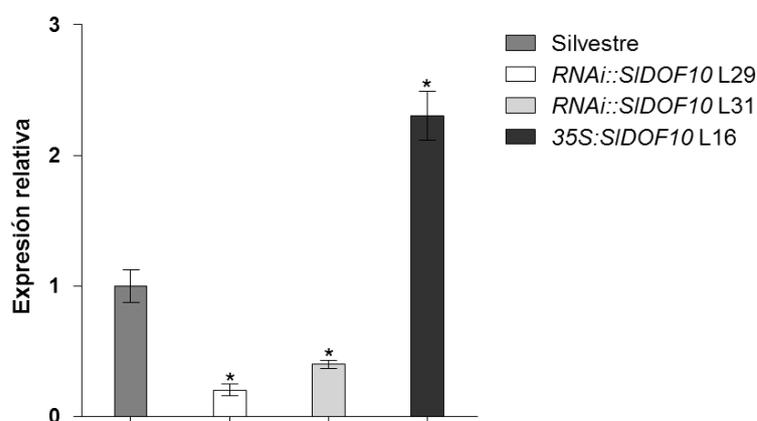


Figura 51. Expresión relativa de *SIDOF10* en la línea transgénicas de silenciamiento y sobre-expresión.

Se muestran los niveles de expresión génica en plantas homocigotas de silenciamiento *RNAi::SIDOF10* L29 y L31 y de sobreexpresión *35S::SIDOF10* L16.

Los niveles de expresión son relativos a los niveles de expresión en la planta silvestre. Las barras de error indican el error estándar de las tres réplicas técnicas. El asterisco indica diferencias significativas de entre las líneas transgénicas y el testigo ($p < 0,05$).

2.1.4 Descripción fenotípica de las plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento del gen *SIDOF10*

2.1.4.1 Caracterización del desarrollo vegetativo

En primer lugar, las plantas se analizaron visualmente, comparando la morfología de las hojas de plantas transgénicas y plantas silvestres. Con nuestras observaciones pudimos determinar que ni la sobre-expresión ni el silenciamiento del en *SIDOF10* ocasionan cambios en la morfología de la hoja.

Posteriormente, para evaluar posibles funciones del gen *SIDOF10* en el control del tiempo de floración, se realizó el conteo del número de hojas verdaderas hasta la formación de la primera inflorescencia. En la figura 52, se puede observar que la medición de este parámetro no evidencia cambios significativos entre las plantas transgénicas y las plantas silvestres. Es decir, que las líneas de sobreexpresión y de silenciamiento del gen *SIDOF10* florecen al mismo tiempo que las plantas silvestres. Todo lo anterior sugiere que cambios en la expresión del gen *SIDOF10* no alteran el desarrollo vegetativo de las plantas ni el tiempo de floración.

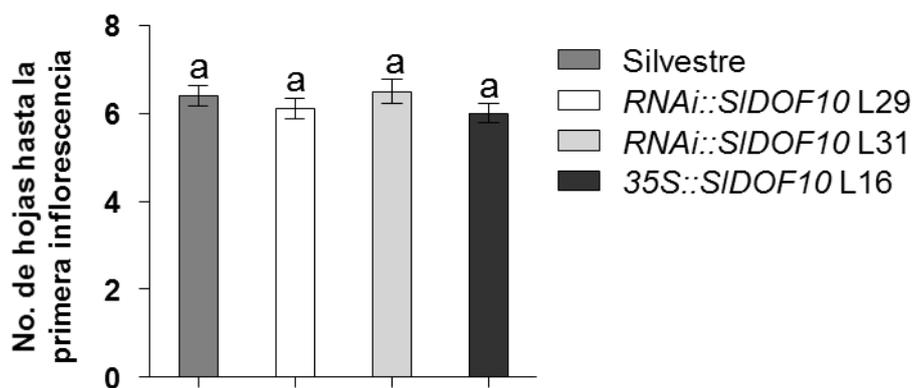


Figura 52. Efecto del silenciamiento y sobre-expresión del gen *SIDOF10* en el tiempo de floración.

Se muestra el número de hojas verdaderas hasta el desarrollo de la primera inflorescencia. Los valores representan la media de los datos obtenidos a partir de 10 plantas. Las barras indican el error estándar. La letra “a” indica que no existen diferencias estadísticamente significativas, según el análisis de varianza ANOVA ($p < 0,05$).

2.1.4.2 Caracterización del desarrollo reproductivo

2.1.4.2.1 Fenotipo floral

En relación al fenotipo floral en plantas de sobre-expresión y silenciamiento del gen *SIDOF10*, visualmente no se aprecia ningún tipo de malformación en las flores (Figura 53). Sin embargo, evidencias experimentales de nuestro estudio sugieren que el gen *SIDOF10* pueda estar involucrado en el desarrollo del óvulo. Por una parte, los análisis del transcrito del gen *SIDOF10* y las líneas *pSIDOF10::GUS*, muestran que la expresión del gen se encuentran en el tejido vascular

del ovario y en el funículo del óvulo y la semilla; por otra parte, el silenciamiento transitorio del gen *SIDOF10*, generaba una reducción en el número de semillas y la presencia de pseudoembriones. Por estas razones nos planteamos analizar el desarrollo del óvulo en las plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento.

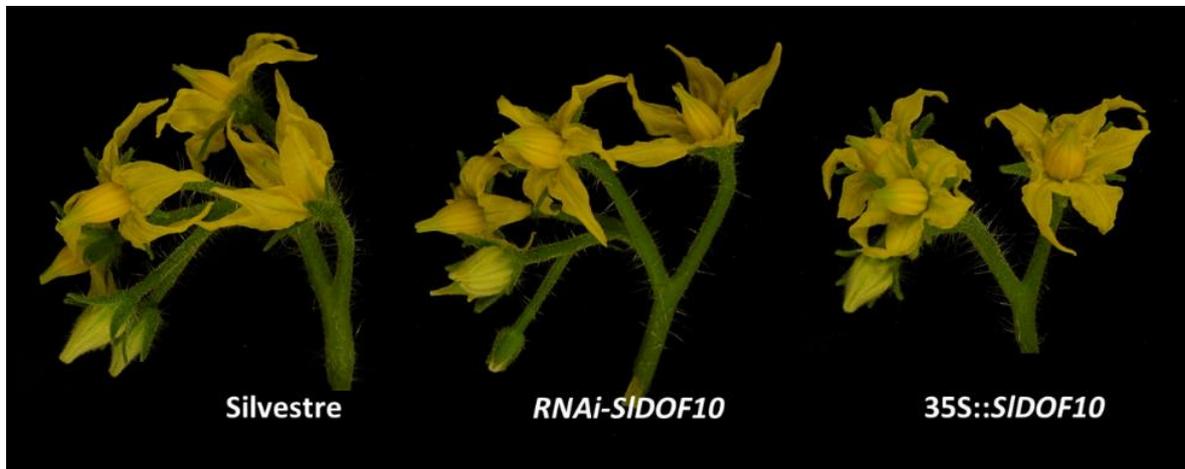


Figura 53. Fenotipo floral de flores transgénicas de silenciamiento y sobre-expresión.

2.1.4.2.2 Desarrollo de los óvulos

A fin de evaluar cambios morfológicos en los óvulos, se tomaron flores de las líneas transgénicas y de plantas silvestres. Estas flores se diseccionaron dejando únicamente los ovarios, que posteriormente se fijaron y se incluyeron en resina, para la realización de cortes longitudinales.

En la observación de los cortes bajo microscopio óptico se pudo apreciar que la morfología de los óvulos en las líneas transgénicas es similar a la de los óvulos de tipo silvestre en cuanto a forma y tamaño (Figura 54). Sin embargo, esta aproximación no permitía corroborar la correcta formación del gametofito femenino.

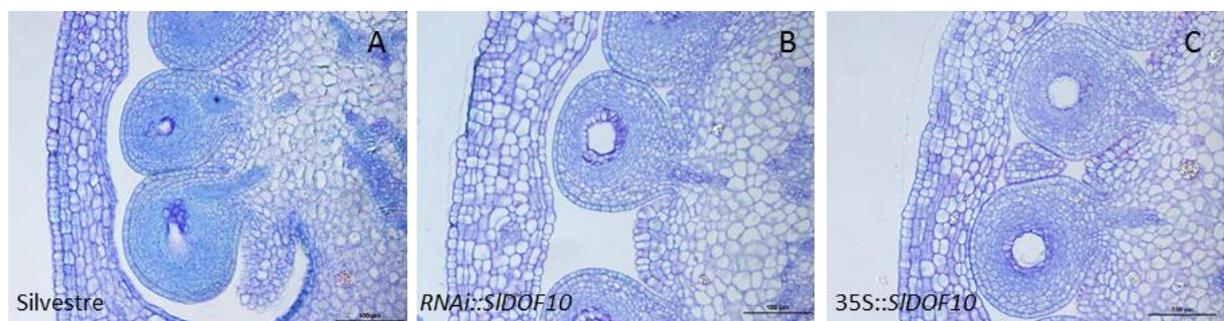


Figura 54. Morfología de óvulos de plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento comparado con óvulos del silvestre. Se muestran cortes longitudinales de ovarios de flores polinizadas, teñidos con toluidina.

- A. Óvulos de planta silvestres
- B. Óvulos de planta *RNAi::SIDOF10* L31
- C. Óvulos de planta *35S::SIDOF10* L16

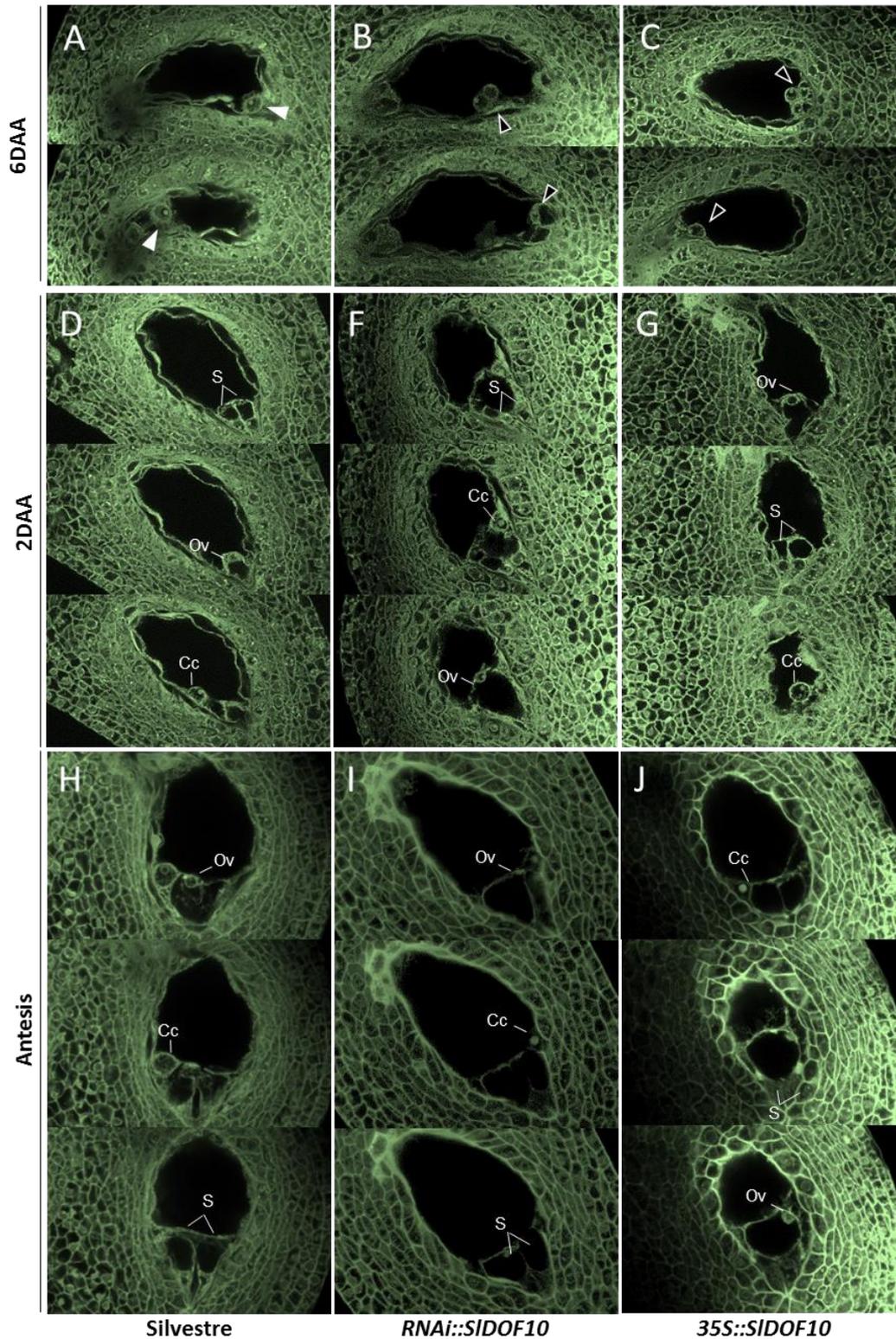


Figura 55. Desarrollo del saco embrionario en flores de plantas transgénicas.

Se muestran tres estadios diferentes 6 días antes de la antesis (DAA), 2 DAA y Antesis.

En cada panel se muestran imágenes de un mismo óvulo en dos o tres planos diferentes.

A, D y H. Óvulos de plantas silvestres.

B, F e I. Óvulos de línea de silenciamiento *RNAi::SIDOF10*.

C, G y J. Óvulos de línea sobre-expresante *35S::SIDOF10*.

A-C. Las flechas blancas señalan las células en división en el óvulo del silvestre, las flechas negras señalan las células en diferenciación en los óvulos de plantas transgénicas.

D- J. Ov, Ovocélula; S, Sinérgidas; Cc, Célula central.

Debido a lo anterior, en este trabajo se realizó un análisis más profundo de los óvulos, a través de la tinción y clareado de los mismos. Se evaluaron los óvulos de plantas transgénicas y plantas silvestres en tres estadios de desarrollo floral: Seis y dos días antes de la antesis (DAA) y en antesis. En el primer estadio evaluado se observa el saco embrionario inmaduro de los óvulos de flores silvestres, esta etapa corresponde a las primeras divisiones mitóticas que ocurren inmediatamente después de la esporogénesis (Figura 55 A). En el mismo estadio las plantas *RNAi::SIDOF10* y *35S::SIDOF10*, presentan óvulos con un desarrollo más avanzado que el de las plantas silvestres (Figura 55 B y C), ya que se observa que las divisiones mitóticas han concluido y se ha iniciado la diferenciación celular.

En las siguientes etapas evaluadas (2DAA y antesis), los óvulos presentan dentro de su saco embrionario un grupo de células diferenciadas que corresponden a: dos células sinérgidas, una ovocélula y la célula central con sus dos núcleos polares. Esta disposición es característica del saco embrionario maduro (Figura 55 D y H). En estas etapas no se observaron diferencias entre las plantas silvestres y plantas transgénicas (Figura 55 D-J). Con lo cual, las alteraciones en el saco embrionario maduro de las plantas transgénicas no son obvias, a pesar del adelanto que existe en las primeras etapas del desarrollo de los óvulos.

2.1.4.2.3 Viabilidad y germinación del polen en plantas transgénicas

Aunque visualmente no se observan malformaciones en los estambres de las plantas transgénicas, los datos del análisis de expresión y la evaluación de plantas *pSIDOF10:GUS*, indicaron que este gen presentaba expresión en los estambres, por esta razón hemos evaluado si cambios en la expresión del gen *SIDOF10* ocasionan alteraciones en el desarrollo del gametofito masculino. Para ello se decidió realizar un análisis de viabilidad y germinación del polen de flores en antesis, provenientes de plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento del gen. Para evaluar la viabilidad se utilizó la tinción de granos de polen con acetato de carmín, y la germinación del polen se evaluó en un medio ya estandarizado para tal fin (ver materiales y métodos).

Tras la tinción con acetato de carmín, los granos de polen viables muestran una coloración rosa, tal y como se observa en el polen de plantas silvestres (Figura 56 A). En las plantas transgénicas *RNAi::SIDOF10* y *35S::SIDOF10* se observa la misma coloración, lo que indica que el polen en ambos casos es viable (Figura 56 B y C). Así mismo, el ensayo de germinación muestra que el polen de las líneas transgénicas germina de forma similar que el polen de plantas silvestres (Figura 56 D-F). Estos resultados indican que en las plantas transgénicas el desarrollo del polen no

se ve afectado por las alteraciones en la expresión del gen *SIDOF10*, es decir, los cambios de expresión del gen no afectan el desarrollo del gametofito masculino.

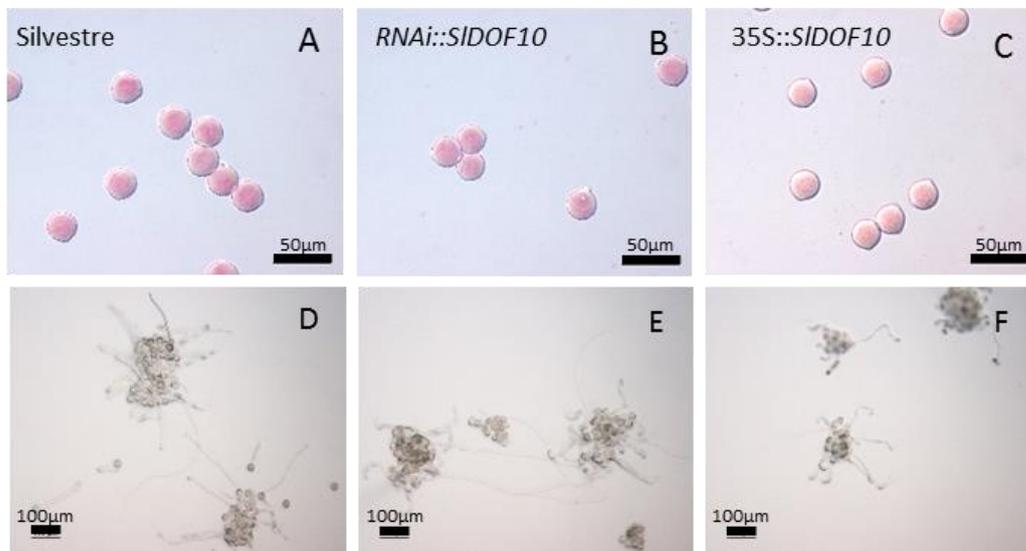


Figura 56. Viabilidad y germinación del polen de plantas transgénicas de sobre-expresión y silenciamiento

A-C. Tinción del polen con acetato de carmín

D-F. Ensayo de germinación del polen.

A y D. Polen de plantas silvestres

B y E. Polen de plantas *RNAi::SIDOF10* L31

C y F. Polen de plantas *35S::SIDOF10* L16

2.1.4.3 Fructificación de plantas transgénicas

En este estudio, diferentes evidencias experimentales indicaban que el gen *SIDOF10* podría estar involucrado en el cuajado del fruto y formación de la semilla. Al observar los frutos de las plantas transgénicas vemos que en las líneas transgénicas de silenciamiento *RNAi::SIDOF10* los frutos presentan una reducción en el tamaño respecto a los frutos de plantas silvestres. En los frutos de la línea sobre-expresante *35S::SIDOF10*, no se aprecia ningún cambio morfológico (Figura 57).

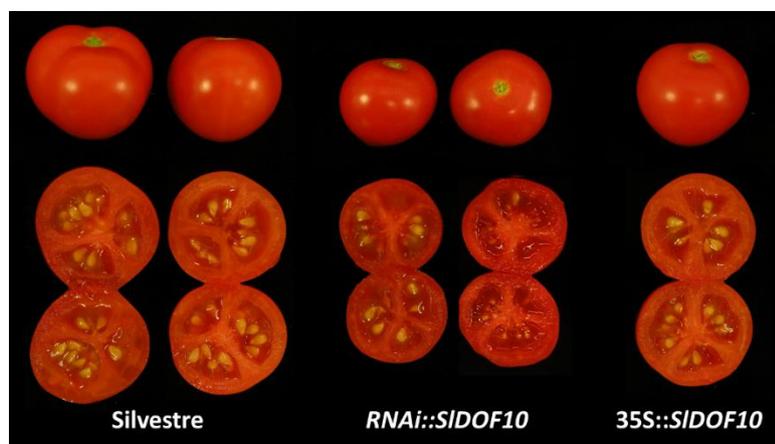


Figura 57. Fenotipo de frutos de líneas transgénicas de sobreexpresión y silenciamiento del gen *SIDOF10*.

Se muestra el fenotipo de frutos de líneas transgénicas T1 de sobre-expresión *35S::SIDOF* y silenciamiento *RNAi::SIDOF* en comparación con el genotipo silvestre.

A fin de evaluar detalladamente los efectos del gen *SIDOF10* sobre la fructificación, hemos analizado diferentes parámetros en las plantas transgénicas, como son: producción de la planta (número de frutos por planta), peso del fruto, número de semillas por fruto, número de frutos partenocárpicos y número de lóculos. En total se evaluaron 10 plantas de cada una de las líneas.

En relación a la producción de las plantas, se hizo un conteo del número total de frutos maduros por cada línea. En plantas silvestres el número promedio de frutos por planta fue de $19,8 \pm 1,4$ (Tabla 17). Si se considera el total del número de frutos por planta las líneas de silenciamiento muestran un incremento significativo, aproximadamente del 30%. Sin embargo, este incremento se debe a una mayor proporción de frutos partenocárpicos, que en las líneas de silenciamiento es el doble (Tabla 17; Figura 58 A). Por otra parte, la línea de sobre-expresión del gen en estudio, *35S::SIDOF10* L6, no muestra cambios significativos en la producción respecto al silvestre (Figura 58 A).

En cuanto al número de frutos con semillas, los resultados muestran que no existen diferencias entre las líneas de silenciamiento y sobreexpresión en comparación con la línea silvestre. Sin embargo, el número de semillas por fruto disminuye significativamente en una de las líneas de silenciamiento (L31) (Tabla 17).

En relación al peso de los frutos, el valor promedio obtenido para las plantas silvestres es de 2,8 gr. En las plantas silenciadas este valor se reduce en un 30%, mientras que la línea *35S::SIDOF10* L6 no presenta variaciones en este parámetro (Figura 58 B). Se sabe, que existe una correlación entre el peso del fruto y el número de semillas por fruto, efectivamente en este estudio el número promedio de frutos con menos de 4 semillas es mayor en las plantas donde el peso promedio del fruto se ve reducido. En general, nuestros resultados sugieren que la disminución en los niveles del transcrito del gen *SIDOF10*, ocasiona una reducción en la formación de semillas, lo cual hace que el tamaño y peso del fruto también se vean afectados negativamente.

A fin de evaluar si los cambios de expresión del gen *SIDOF10* se relacionan con cambios morfológicos en el carpelo, se contó el número de lóculos por fruto de cada línea. Para este parámetro no existen diferencias entre la línea sobre-expresante y la línea silvestre. Sin embargo, en las plantas de silenciamiento se produjo un aumento significativo en el número de lóculos (Figura 58 C).

	Número de frutos por planta	Frutos Partenocápicos (0-4 semillas)	Frutos con semillas (>4 semillas)	Semillas/fruto
Silvestre	19,8 ± 1,4 a	10,4 ± 1,9 a	9,1 ± 1,0 a	17,3 ± 1,4 a
<i>RNAi::SIDOF10</i> L29	26,9 ± 3,5 b	19,5 ± 3,3 b	7,4 ± 1,2 a	16,3 ± 1,2 a
<i>RNAi::SIDOF10</i> L31	26,0 ± 2,8 b	19,0 ± 3,2 b	7,0 ± 1,3 a	14,1 ± 1,2 b
<i>35S::SIDOF10</i> L16	18,5 ± 1,4 a	12,2 ± 1,7 a	7,4 ± 1,2 a	16,3 ± 1,2 a

Tabla 17. Efecto del silenciamiento y sobre-expresión del gen *SIDOF10* en la producción de la planta y el desarrollo de las semillas.

Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según el análisis de varianza ANOVA ($p < 0,05$).

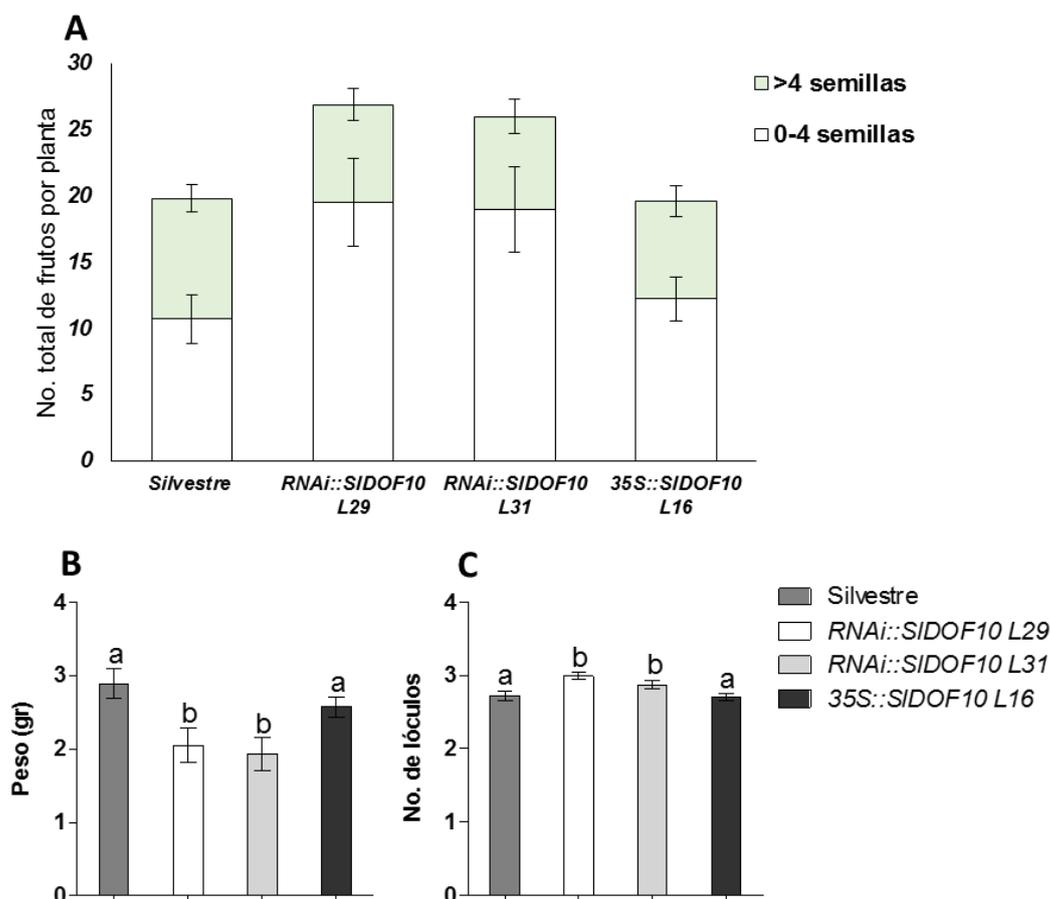


Figura 58. Efecto del silenciamiento y sobre-expresión del gen *SIDOF10* en la fructificación y el desarrollo de las semillas.

A. Número de frutos maduros por planta clasificados según el número de semillas por fruto

B. Peso del fruto

C. Número de lóculos

Los datos representan la media del análisis de 10 plantas por cada una de las líneas. Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según el análisis de varianza ANOVA ($p < 0,05$).

2.1.4.4 Desarrollo vascular en tejido reproductivo de plantas transgénicas

En la caracterización molecular del gen *SIDOF10*, los análisis de expresión espacio-temporal sugerían que *SIDOF10* podía estar relacionado con el desarrollo del tejido vascular de la flor, especialmente en el ovario. Dada la complejidad de la estructura del ovario para evaluar posibles alteraciones en el tejido vascular, se decidió analizar la organización vascular en el pedicelo de la

flor, ya que es la zona con desarrollo radial más próxima al ovario. En esta ocasión se tomaron pedicelos de flores no polinizadas (2 DAA) y se incluyeron en resina.

En cortes transversales del pedicelo se pudo apreciar el desarrollo del anillo vascular con su característica organización biclateral mencionada previamente (Figuras 59 A y 60 A). Hemos medido el área del anillo en cada una de las líneas, encontrando que en plantas silenciadas el área disminuye mientras que en la línea sobreexpresante aumenta (Figura 59 D). Las diferencias encontradas podrían deberse al número de haces vasculares, que en el pedicelo de plantas silvestres varía entre 10 y 12 haces. Sin embargo, los resultados muestran que el número de haces vasculares en ambos casos es similar al del silvestre (Figura 60 E).

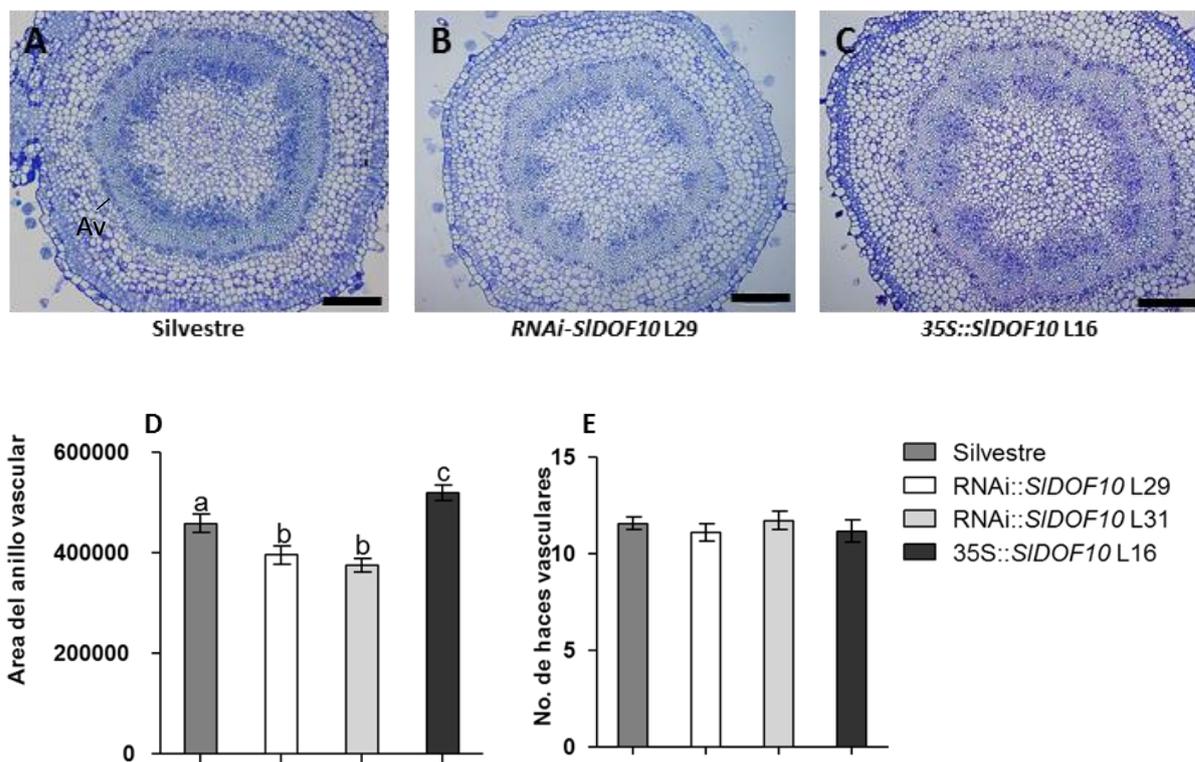


Figura 59. Características del anillo vascular del pedicelo en plantas de silenciamiento y sobre-expresión del gen *SIDOF10*.

A. Pedicelo de plantas silvestres. Anillo vascular (Av).

B. Pedicelo de línea silenciada (L29).

C. Pedicelo de línea de sobre-expresión (L16).

A-C. Cortes transversales de pedicelos (flor no polinizadas 2DAA) teñidos con toluidina.

D. Área del anillo vascular

E. Número promedio de haces vasculares.

Se muestra la comparación de las líneas transgénicas de sobreexpresión y silenciamiento con el silvestre.

Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, según el análisis de varianza ANOVA ($p < 0,05$).

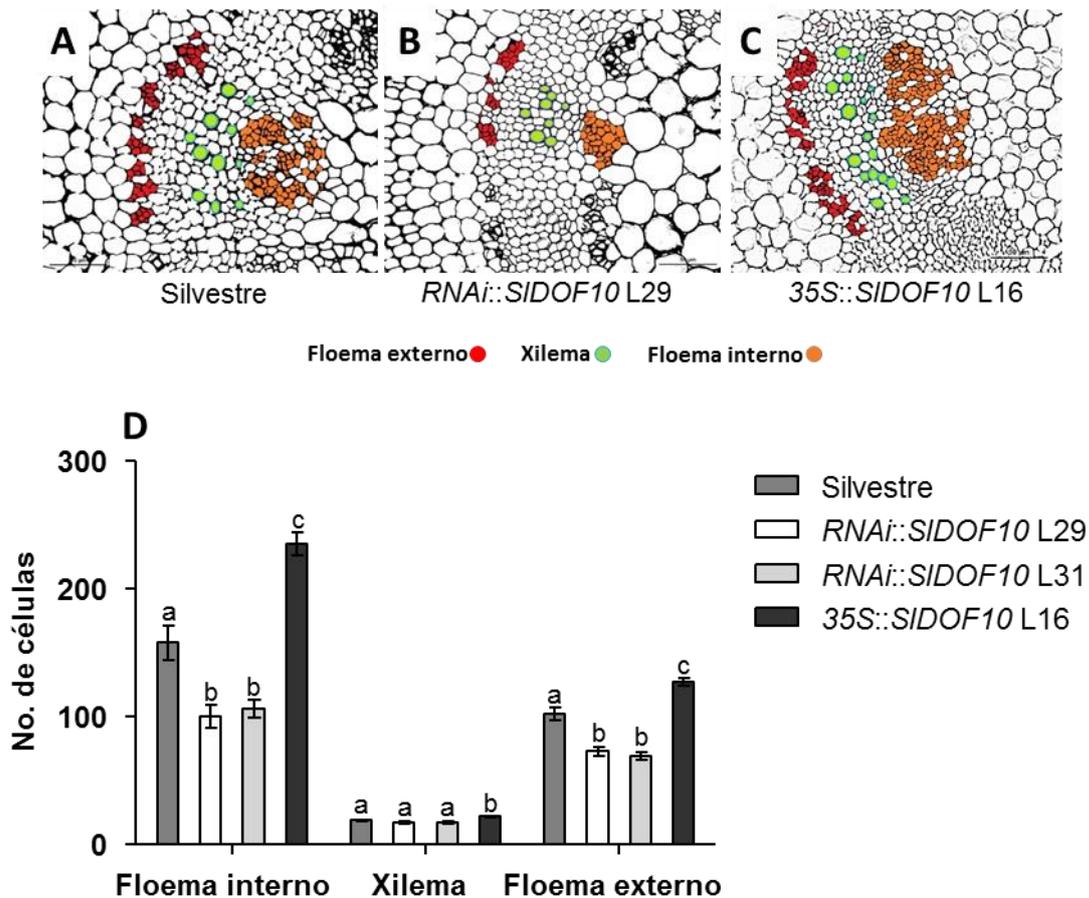


Figura 60. Efecto del silenciamiento y sobre-expresión del gen *SIDOF10* sobre el patrón vascular del pedicelo.

A. Silvestre.

B. Línea transgénica de silenciamiento (L29).

C. Línea transgénica de sobre-expresión (L16).

A-C. Se muestra un haz vascular del pedicelo para cada tipo de planta. En rojo se señala el floema externo, en verde el xilema y en naranja el floema interno.

D. Número de células de acuerdo al tipo celular. Los datos representan la media del número de células en el floema externo, xilema y floema interno en los haces vasculares del pedicelo. Se tomaron pedicelos de flores no polinizadas (2DAA) de las líneas transgénicas de sobreexpresión *35S::SIDOF10* L16 y silenciamiento *RNAi::SIDOF10* L29 y L31, comparadas con plantas silvestres.

En un análisis detallado de los haces vasculares, se observó la organización del floema y xilema, se identificó la presencia de células aglomeradas al interior y al exterior del anillo, que corresponden al floema interno y al floema externo, respectivamente (Figura 60 A-C). Así mismo se identificaron las células del xilema que se desarrollan en el espacio intermedio que existe entre los dos floemas (Figura 60 A-C). Teniendo en cuenta el tipo organización del tejido vascular en tomate, se hizo un conteo del número de células tanto del floema interno como el externo, al igual que de las células del xilema. Los resultados mostraron que el número promedio de células en las líneas de sobre-expresión es mayor que en las plantas silvestres, y el mayor incremento se produce en el floema interno del haz vascular (Figura 60 E). El efecto contrario se observa en las líneas transgénicas de silenciamiento donde el descenso en la expresión de *SIDOF10* ocasiona la disminución del número

de células del floema interno y externo, sin embargo no hay variación en el xilema (Figura 60 E). Estos resultados indican que cambios en los niveles de expresión del gen *SIDOF10* modifican el número de células de xilema y floema en los haces vasculares aunque no su número, esto sugiere que el gen *SIDOF10* participa en el desarrollo del sistema vascular del pedicelo de la flor en tomate, promoviendo la proliferación celular.

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

La regulación de procesos de desarrollo de la planta, dentro de los cuales se encuentra la fructificación, se lleva a cabo en gran parte por medio de genes que codifican factores de transcripción. A partir del análisis transcriptómico del desarrollo autónomo del ovario de una línea partenocárpica generada en nuestro laboratorio, hicimos una búsqueda de genes reguladores diferencialmente expresados, identificando el gen *SIDOF10*. La caracterización molecular y el análisis funcional del gen *SIDOF10*, indican que este gen está implicado en el desarrollo vascular del ovario y participa en el proceso de cuajado del fruto

3 El gen *SIDOF10* codifica un factor de transcripción de tipo *Zinc Finger*, perteneciente a una familia de proteínas específica de plantas

En el análisis *in silico* del gen candidato SGN-U584226 (posteriormente *SIDOF10*), se observó que este gen codifica una proteína de 260 residuos de aminoácidos, en la cual se identificó un dominio tipo *Zinc Finger*. Las proteínas tipo *Zinc Finger* o Dedo de Zinc, son factores de transcripción y juegan un rol importante en las células eucariotas, ya que regulan diferentes vías de transducción de señal y controlan procesos como el desarrollo y la muerte celular programada. Este dominio permite la interacción o la unión al DNA, RNA u otras proteínas y está presente en el proteoma de muchos organismos. Existen diferentes tipos de proteínas *Zinc Finger*, que han sido clasificadas de acuerdo al número y orden de los residuos de cisteína e histidina que coordinan el átomo de Zinc, como C2H2, C2HC, C2C2, C2HCC2C2, C2C2C2C2, etc (Ciftci-Yilmaz and Mittler 2008). La proteína deducida del gen en estudio presenta un único Dedo de Zinc de tipo C2C2, que se conoce con el nombre de DOF (*DNA-binding with one finger*). Las proteínas pertenecientes a la familia DOF son factores transcripcionales implicados en la regulación de la expresión génica de procesos específicos de plantas (Yanagisawa 2002) y se caracterizan por ser proteínas bi-funcionales, es decir, que median no solo en la unión al DNA sino también las interacciones proteína-proteína (Yanagisawa 2004). En tomate se han identificado 34 genes tipo DOF (Cai *et al.* 2013) dentro de los cuales se encuentra el gen *SIDOF10*.

Al realizar un BLAST de la proteína deducida del gen *SIDOF10*, se obtuvieron secuencias proteicas homólogas de distintas especies vegetales: *Solanum tuberosum*, *Citrus clementino*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera*, *Ricinus communis*, *Malus domestica*, *Glycine max* y *Cucumis sativus*. Esto indica que la función de *SIDOF10* posiblemente esté conservada en distintas especies. En el alineamiento de las proteínas homólogas encontradas, se observó una región altamente conservada que corresponde al dominio *Zinc Finger*. Generalmente el dominio DOF se localiza cerca del extremo N-terminal de la proteína y está formado por una región de 52 residuos de aminoácidos, que contienen una cadena de cuatro cisteínas que coordinan el átomo de Zinc. Este

motivo es esencial para la unión al DNA y la mutación de cualquiera de las cuatro cisteínas produce cambios dramáticos en la configuración del Dedo de Zinc (Yanagisawa 2004). En el alineamiento también se pudo identificar la presencia de una señal de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés) bipartita, conservada en todas las proteínas analizadas (Krebs *et al.* 2010). Las proteínas reguladoras dependen de la presencia de una de éstas señales para su translocación dentro del núcleo (Jans and Hubner 1996). En nuestro trabajo se demostró que la señal de localización nuclear bipartita es funcional, ya que a nivel subcelular la proteína SIDOF10 se localiza en el núcleo, lo cual es consistente con la función de SIDOF10 como un factor de transcripción.

4 El gen *SIDOF10* y su parálogo *SIDOF31* no tienen funciones redundantes

Un estudio filogenético de los 34 genes tipo DOF de tomate sugirió que los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* se originaron en una de las duplicaciones más antiguas dentro de esta familia (Cai *et al.* 2013). En nuestro trabajo la comparación de estos dos genes revela que hay una alta divergencia tanto a nivel de secuencia de DNA como proteica. De hecho, el análisis filogenético realizado sugiere que la duplicación de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* precede a la diversificación de las especies utilizadas en el estudio. Posiblemente su origen coincide con una de las primeras duplicaciones del genoma ocurridos durante el proceso evolutivo del tomate (Song *et al.* 2012).

El nivel de expresión de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* es similar a lo largo de toda la vida de la planta. Curiosamente, nuestros resultados difieren en parte de los reportados por Cai y colaboradores en el año 2013, quienes describieron que la expresión de *SIDOF10* en flores es muy baja (Cai *et al.* 2013). La discrepancia con nuestros resultados podrían deberse a las diferencias en el estadio de desarrollo de los tejidos elegidos para los análisis. En cuanto a sus patrones de expresión, aunque los niveles de transcritos de los dos genes son similares, la localización del mensajero en los tejidos del ovario es diferente. El transcrito del gen *SIDOF10* se localiza en los haces vasculares mientras que el gen *SIDOF31* se expresa en el estilo de la flor y en el óvulo. El silenciamiento transitorio de los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* sugiere que ambos genes se requieren para el correcto desarrollo del ovario y de las semillas. Sin embargo, la función que desempeñan durante el desarrollo del ovario es diferente ya que mientras que el gen *SIDOF10* participa en el desarrollo vascular, el gen *SIDOF31* parece estar participando en la formación de los lóculos. Por tanto, independientemente de su origen común, los genes *SIDOF10* y *SIDOF31* no parecen tener funciones redundantes en el desarrollo del ovario y el fruto.

5 Regulación de la expresión del gen *SIDOF10*

Dentro de los estudios de regulación génica a nivel transcripcional, se han caracterizado diferentes elementos reguladores en *cis* conservados en plantas. Estos elementos son secuencias de DNA localizadas en las regiones no codificantes, generalmente de la región promotora de los genes. A partir de la organización de elementos reguladores en bases de datos, se han generado herramientas bioinformáticas con las cuales se puede predecir dónde se expresa un gen, además de los factores que pueden estar participando en su regulación. En el estudio de la secuencia promotora del gen *SIDOF10*, hemos identificado varios elementos hipotéticos de regulación en *cis* dentro de los cuales destacan distintos motivos de regulación hormonal, así como numerosos motivos de regulación por luz. Se ha descrito un número importante de factores de transcripción tipo DOF cuya expresión se regula en respuesta a luz, respondiendo a señales del fitocromo y citocromo y que están sujetos al control del ritmo circadiano (Papi *et al.* 2002; Park *et al.* 2003; Ward *et al.* 2005; Yang *et al.* 2011).

5.1 Regulación hormonal del gen *SIDOF10*

Como previamente se ha señalado, la regulación hormonal desempeña un papel muy importante durante el cuajado y desarrollo del fruto. En el análisis *in silico* del promotor del gen *SIDOF10*, hemos detectado varios motivos de regulación en respuesta a hormonas, los cuales sugieren la posible regulación hormonal de su expresión.

Por una parte, se detectaron elementos de regulación por ácido jasmónico. Tradicionalmente esta hormona se ha asociado a la regulación de la respuesta a estreses bióticos y abióticos. Sin embargo, existen algunas evidencias que indican que el ácido jasmónico podría estar implicado en el desarrollo de la flor y el fruto (Wasternack *et al.* 2013). En tomate se describió que el mutante *jai-1* (*JA-insensitive-1*) muestra esterilidad del gametofito femenino y que además produce frutos partenocárpicos. Este fenotipo está asociado a la pérdida de función del gen *LeCOI-1*, homólogo al gen *COI-1* de *Arabidopsis*, el cual forma parte de la ruta de señalización del ácido jasmónico (Li *et al.* 2004a). Debido a lo anterior, no se descarta que esta hormona pueda participar en la regulación de la expresión del gen *SIDOF10* durante el cuajado y desarrollo del fruto.

El promotor del gen *SIDOF10* contiene al menos 30 elementos de regulación en respuesta a citoquininas. Estas fitohormonas regulan numerosos procesos de desarrollo, incluyendo la actividad meristemática en brotes y raíces, reproducción, senescencia de la hoja, respuesta a señales ambientales como luz y nutrientes, y desarrollo vascular (Argueso *et al.* 2009b; Werner and Schmulling 2009). En particular durante el desarrollo vascular la señalización por citoquininas se requiere para establecer la identidad de las células del procambium, durante la primera fase de

desarrollo de raíces en *Arabidopsis* (Mahonen *et al.* 2000; Mahonen *et al.* 2006). Además las citoquininas controlan la proliferación de las células vasculares durante el desarrollo primario del tejido vascular tanto en raíz como en brotes de plantas (Mahonen *et al.* 2000; Werner *et al.* 2003). Dado que la expresión de *SIDOF10* se localiza en tejido vascular y que cambios en los niveles de expresión de este gen en plantas transgénicas de silenciamiento y sobre-expresión afectan el desarrollo de los haces vasculares y en particular a la proliferación celular, las citoquininas podrían participar en la regulación de la expresión del gen *SIDOF10*.

El promotor del gen *SIDOF10* contiene a su vez varios elementos de regulación en respuesta a giberelinas (GARE) específicos de endospermo. Evidencias experimentales en *Arabidopsis* y en cereales han demostrado que numerosos genes que contienen un enriquecimiento de elementos GARE en sus promotores, están regulados positivamente en semillas (Bastian *et al.* 2010), proceso en el cual los genes *GAMYB* parecen tener un papel importante. Estos genes se unen específicamente al motivo GARE (TAACAAA) en presencia de GA y activan la transcripción de genes en las células de la aleurona, así como genes específicos del endospermo en diferentes especies vegetales (Gubler *et al.* 1995; Diaz *et al.* 2002; Mena *et al.* 2002). Aunque en el presente estudio no se ha analizado la expresión del gen *SIDOF10* en semillas, la presencia de estos motivos GARE en el promotor del gen *SIDOF10* sugieren que podría estar implicado en el desarrollo y formación de la semilla y podría ser la causa de que el silenciamiento del gen reduzca el número de semillas.

Los estudios en el proceso del cuajado del fruto, indican que las auxinas son uno de los principales reguladores de este proceso. El promotor del gen *SIDOF10* contiene tres elementos de regulación en respuesta a auxinas (elementos ER-Aux). Los factores de respuesta a auxinas son activadores o represores que se unen con especificidad a los elementos ER-Aux en los promotores de genes de respuesta temprana a auxinas (revisado Guilfoyle y Hagen 2007). En nuestro estudio se demostró que la expresión del gen *SIDOF10* en ovarios no polinizados se activa en presencia de auxinas. Esta evidencia y la presencia de elementos ER-Aux en su promotor, sugieren que *SIDOF10* es un gen de respuesta a auxinas y que la activación de su expresión podría estar sujeta a la presencia de factores de respuesta a auxinas.

En tomate se han identificado 17 genes que codifican factores de respuesta a auxina o ARFs (Kumar *et al.* 2011) y algunos de ellos han sido relacionados con el cuajado del fruto. Dentro de este grupo se encuentra el gen *SIARF7* cuya expresión es elevada en flores durante las etapas previas a la polinización y decrece rápidamente cuando ésta tiene lugar. La reducción de los niveles del transcrito del gen *SIARF7* causa la formación de frutos partenocárpicos, por lo cual este

gen ha sido propuesto como un regulador negativo del cuajado del fruto (Vriezen *et al.* 2008; de Jong *et al.* 2009b). Así mismo el gen *SIARF8* (homólogo del gen *AtARF8* de *Arabidopsis*) también se ha asociado con la regulación del cuajado del fruto en tomate. La expresión de formas aberrantes de *AtARF8* en plantas de tomate causan la formación de frutos partenocárpicos (Goetz *et al.* 2006; Goetz *et al.* 2007). En nuestros análisis hemos detectado que la expresión del gen *SIDOF10* en tomate se localiza en el funículo del óvulo y de la semilla. Los estudios de caracterización de los genes *ARF8* y *SIARF7* mostraron que ambos genes se expresan en el tejido vascular del funículo (Goetz *et al.* 2006; Goetz *et al.* 2007; de Jong *et al.* 2009b). El solapamiento de los patrones de expresión entre los genes *ARF* descritos y *SIDOF10*, sugiere que posiblemente alguno de estos genes o ambos puedan estar implicados en la regulación del gen *SIDOF10*. Sin embargo, hacen falta experimentos adicionales que ayuden a confirmar esta hipótesis.

Numerosos estudios han demostrado que las auxinas juegan un papel esencial en el crecimiento de la raíz y el desarrollo de raíces laterales (revisado por Péret *et al.* 2009). Se debe establecer un máximo de auxinas para que se inicie apropiadamente una nueva raíz lateral (Benkova *et al.* 2003; Geldner *et al.* 2004). Durante nuestro estudio también detectamos que el transcrito del gen *SIDOF10* se encuentra en las raíces, específicamente en el meristemo apical y en las regiones donde se va a formar una raíz lateral lo cual apoya nuevamente la regulación del gen por auxinas.

Todas estas evidencias apuntan a que las auxinas desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión del gen *SIDOF10* y, en este sentido, el gen *SIDOF10* podría considerarse un gen de respuesta a auxinas. (Peret *et al.* 2009).

6 El gen *SIDOF10* participa en el desarrollo vascular de la planta

El desarrollo vascular se inicia mediante la formación del procambium, a partir del cual se diferencian los dos tejidos conductores: xilema y floema (revisado por Jung y Park, 2007). La caracterización funcional del gen *SIDOF10* demuestra que este gen está involucrado en el desarrollo del tejido vascular, específicamente en el control de la proliferación celular de los tejidos que componen los haces vasculares en el pedicelo de la flor. Estos resultados son consistentes con el hecho de que este gen esté regulado por auxinas, ya que se ha establecido que el ácido indolacético (la auxina predominante en plantas superiores) es esencial para el desarrollo del tejido vascular. Las auxinas promueve la división celular del cambium, induce la diferenciación de los elementos traqueales del xilema y contribuye a mantener la continuidad vascular entre los diferentes órganos de la planta (Revisado por Caño *et al.* 2010). En *Arabidopsis* se han identificado los genes *YUCCA*, los miembros de esta familia codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de auxinas. El cuádruple mutante *yuc1yuc2yuc4yuc6* presenta un fenotipo en el

cual está afectado el número de venas, la continuidad vascular y el patrón vascular tanto en hojas como en flores, demostrando que las auxinas son esenciales para la formación y establecimiento del patrón del tejido vascular (Cheng *et al.* 2006).

En los últimos años, se han identificado factores de transcripción pertenecientes a distintas familias proteicas que participan en el desarrollo del sistema vascular, entre las cuales se incluyen proteínas bHLH, HD-ZIP, ARF-GAP, AT-Hook y DOF, lo cual sugiere la existencia de complejos proteicos que regulan este proceso (Revisado por Le Hir and Bellini 2013). Dado que los resultados del presente estudio demuestran que el gen *SIDOF10* está directamente implicado en la formación del tejido vascular, es posible que este factor de transcripción forme parte de algún complejo proteico implicado en este proceso. Esta interacción podría tener lugar a través del dominio DOF ya que se ha descrito como un dominio bi-funcional que puede mediar tanto la unión a DNA como participar en interacciones proteína-proteína (Yanagisawa 2002).

Existen numerosas proteínas tipo DOF implicadas en el desarrollo del sistema vascular de plantas. Estudios llevados a cabo en *Arabidopsis* demuestran que proteínas de esta familia están involucradas en la regulación de la formación del tejido vascular en diferentes etapas de desarrollo (Konishi and Yanagisawa 2007; Guo *et al.* 2009; Gardiner *et al.* 2010). De hecho se ha descrito que casi todos los factores de transcripción tipo DOF en *Arabidopsis* están potencialmente expresados en el tejido vascular (Le Hir and Bellini 2013). Konishi and Yanagisawa (2007) identificaron dos genes que codifican factores transcripcionales tipo DOF (*AtDof5.8* y *AtDof2.4*) que pueden estar implicados en la formación del procambium. A diferencia del gen *SIDOF10*, estos genes se expresan únicamente durante etapas muy tempranas de la formación del tejido vascular mientras que el gen *SIDOF10* parece estar expresándose a lo largo de todo el desarrollo y muestra expresión en todos los grupos celulares que componen el anillo vascular. Se han descrito otros tres genes tipo DOF en *Arabidopsis* (*AtDof2.1*, *AtDof4.6* y *AtDof5.3*) que presentan expresión en el sistema vascular de la raíz y en las hojas (Birnbaum *et al.* 2003; Gardiner *et al.* 2010). De manera similar hemos encontrado que la expresión del gen *SIDOF10* se localiza asociada al sistema vascular tanto en cotiledones como en hojas verdaderas y en la zona distal de la raíz.

Por otra parte, Guo y colaboradores (2009) detectaron que el gen *AtDof5.6/HCA2* se expresa en la vasculatura de todos los órganos, particularmente en el cambium, el floema y las células del parénquima interfascicular del tallo de la inflorescencia. El estudio del mutante de ganancia de función *hca2* de *Arabidopsis* demostró que la sobre-expresión del gen *AtDof5.6* causa la

formación precoz del cambium interfascicular y su consecuente división celular. De manera inversa, la

represión de la proteína AtDof 5.6/HCA2 da como resultado la disrupción de la formación del cambium interfascicular en etapas muy tempranas del desarrollo del tallo de la inflorescencia (Guo *et al.* 2009). De la misma forma, la sobre-expresión del gen *SIDOF10* induce una mayor proliferación celular en el tejido vascular del pedicelo, mientras que el silenciamiento del gen causa una disminución en el número de células, aunque no bloquea el desarrollo del tejido vascular. Por tanto, el gen *SIDOF10* participa redundantemente con otros genes en la formación del tejido vascular, y se puede considerar un regulador positivo de la proliferación celular durante el desarrollo de este tejido. Este sería el primer análisis funcional de un factor de transcripción tipo DOF de tomate involucrado en este proceso.

7 Implicación del gen *SIDOF10* en el cuajado del fruto

El cuajado del fruto es uno de los procesos más importantes en la vida de las plantas angiospermas y se define como la transición del estado quiescente del ovario a un rápido crecimiento para formar un fruto. En condiciones normales, el inicio de la formación del fruto depende de una exitosa polinización y fecundación de los óvulos (Gillaspy *et al.* 1993; de Jong *et al.* 2009a). Sin embargo, la estimulación promovida por la polinización y la fertilización en el cuajado del fruto puede ser sustituida por el aumento en la concentración de hormonas tales como giberelinas y auxinas, lo cual promueve la formación de frutos partenocárpicos (Gillaspy *et al.* 1993; Vivian-Smith *et al.* 2001; Gorguet *et al.* 2005; Medina *et al.* 2013). Dentro del análisis funcional del gen *SIDOF10* se observó que la reducción de los niveles del transcrito causa un aumento en el desarrollo de frutos partenocárpicos y una disminución en el tamaño del fruto y en el número de semillas.

Existe una correlación positiva entre el tamaño del fruto y el número de semillas (Varga and Bruinsma, 1976). La disminución en el número de semillas en plantas de silenciamiento del gen *SIDOF* podría ser la causa de la reducción en el tamaño del fruto observada en estas plantas. Por otra parte, la reproducción de las plantas y en particular el desarrollo de los frutos dependen en gran medida de un adecuado importe de fotoasimilados a través del floema. Las hojas son la primera fuente de nutrientes durante el desarrollo temprano de la flor y el desarrollo del fruto (Ruan *et al.* 2012). Sin embargo, los requerimientos de fotoasimilados durante el desarrollo floral y durante el cuajado del fruto son menores en comparación con la subsecuente fase de llenado del fruto (Ruan *et al.* 2012). En nuestro caso, la disminución en el número de células del tejido vascular del pedicelo en plantas de silenciamiento del gen *SIDOF10*, podría tener como

consecuencia una reducción en el flujo de fotoasimilados que llegan al fruto y ser la causa de la disminución del tamaño del fruto en estas plantas.

En relación a las auxinas, estas hormonas se transportan de forma basipétala (Lewis and Muday 2009), es decir, desde los tejidos de síntesis (hojas jóvenes y flores) en la parte apical hacia la base de la planta, llegando a los distintos órganos a través del sistema vascular (Petrášek and Friml 2009). En distintas especies se ha demostrado que la aplicación de inhibidores del transporte de auxinas en ovarios o en el pedicelo de las flores, inducen la producción de frutos partenocárpicos en ausencia de polinización y fertilización (Kim *et al.* 1992; Serrani *et al.* 2010; Pattison and Catalá 2012). Al inhibir el transporte se bloquea el flujo de auxinas desde el óvulo al resto de la planta, generando una acumulación de auxinas que induce el crecimiento del fruto sin necesidad de fertilización (Serrani *et al.* 2010; Pattison and Catalá 2012). En tomate, las líneas de silenciamiento del gen *SIPIN4* exhiben una disminución en el desarrollo del tejido vascular secundario en el tallo (Pattison and Catalá 2012). Además los niveles reducidos del transcrito del gen *SIPIN4* promueven el crecimiento precoz del ovario generando así frutos partenocárpicos (Mounet *et al.*, 2012). De manera similar, el aumento en la formación de frutos partenocárpicos en plantas de silenciamiento *RNAi::SIDOF10*, podría deberse a que la reducción del tejido vascular reduce el flujo de auxinas a través del pedicelo y en consecuencia se produce una acumulación de la hormona dentro del ovario que induce su crecimiento prematuro.

En resumen, nuestros resultados sugieren que el gen *SIDOF10* podría actuar como un represor del proceso de cuajado del fruto de manera indirecta a través de su papel en el desarrollo del sistema vascular, o directamente evitando el crecimiento anticipado del ovario.

VI. CONCLUSIONES

El análisis de genotipos partenocárpicos de tomate, como herramienta para la identificación de genes y mecanismos implicados en el control del desarrollo del ovario y el cuajado del fruto, nos han permitido aportar al conocimiento de estos procesos las siguientes conclusiones:

PRIMERA: Las flores de plantas mutantes *hydra* no presentan desarrollo de los gametofitos y son estériles. Este resultado indica que el gen *HYDRA* tiene un papel central en el desarrollo de los gametofitos masculino y femenino y que el mecanismo que controla ambos procesos tiene elementos comunes.

SEGUNDA: En plantas mutantes *hydra* el desarrollo del fruto tiene lugar sin que ocurra la polinización y fertilización, generando frutos partenocárpicos. Este fenotipo sugiere que el desarrollo de los gametos regula negativamente el crecimiento del ovario no polinizado.

TERCERA: La inducción del crecimiento del ovario en ausencia de fertilización en plantas *hyd-1*, no depende de la síntesis de GAs. Sin embargo, las GAs participan en el crecimiento del fruto una vez ocurre el cuajado.

CUARTA: En plantas *hyd-1* existe una alteración en el transporte polar de auxinas durante el desarrollo de la flor en las etapas previas a la antesis. Esta alteración conlleva la activación de la ruta de señalización por auxinas en los estambres y una distorsión en el patrón de localización de la hormona dentro del ovario. La pérdida de los gradientes de auxinas en el ovario podría ser la causa de la ausencia de gametofitos y del desarrollo partenocárpico del fruto.

QUINTA: La mutación *hydra* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7, donde no se ha identificado ningún otro locus o QTL asociado a la partenocarpia. Por tanto, la mutación *hydra* representa una nueva fuente de partenocarpia en tomate.

SEXTA: La proteína codificada por el gen *SIDOF10* se localiza en el núcleo y pertenece a una familia de factores de transcripción tipo Zinc Finger específica de plantas.

SÉPTIMA: Los genes parálogos *SIDOF10* y *SIDOF31* no tienen funciones redundantes durante el desarrollo del ovario y el cuajado del fruto en tomate.

OCTAVA: La presencia de motivos de regulación por auxinas en la región promotora del gen *SIDOF10* y la activación de su expresión mediante tratamientos exógenos con ácido indolacético,

sugieren que las auxinas desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión del gen y, en este sentido, el gen *SIDOF10* podría considerarse un gen de respuesta a auxinas.

NOVENA: El patrón de expresión del gen *SIDOF10* sugiere que podría estar implicado en el desarrollo vascular durante todo el ciclo de vida de la planta.

DÉCIMA: Cambios en los niveles de expresión del gen *SIDOF10* (silenciamiento y sobre-expresión) modifican el número de células del tejido vascular del pedicelo de la flor, sugiriendo que el gen *SIDOF10* participa en el control de la proliferación celular durante el desarrollo vascular del pedicelo de la flor.

UNDÉCIMA: Durante la etapa reproductiva, la reducción de expresión del gen *SIDOF10* genera una disminución del tamaño del fruto, una reducción del número de semillas y un aumento en el desarrollo de frutos partenocárpicos. Por tanto, la expresión del gen *SIDOF10* es necesaria para el correcto desarrollo del ovario, el cuajado del fruto y la formación de las semillas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abad M, Monteiro A. 1989. The use of auxins for the production of greenhouse tomatoes in mild-winter conditions—a review. *Scientia Horticulturae* **38**: 167–192.
- Achard P, Genschik P. 2009. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1085-1092.
- Alabadi D, Aguero MS, Perez-Amador MA, Carbonell J. 1996. Arginase, Arginine Decarboxylase, Ornithine Decarboxylase, and Polyamines in Tomato Ovaries (Changes in Unpollinated Ovaries and Parthenocarpic Fruits Induced by Auxin or Gibberellin) *Plant Physiology* **112**: 1237-1244.
- Alabadi D, Blazquez MA, Carbonell J, Ferrandiz C, Perez-Amador MA. 2009. Instructive roles for hormones in plant development. *The International journal of developmental biology* **53**: 1597-1608.
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI. 2006. Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. *Planta* **223**: 315-328.
- Ampomah-Dwamena C, Morris BA, Sutherland P, Veit B, Yao J-L. 2002. Down-Regulation of TM29, a Tomato SEPALLATA Homolog, Causes Parthenocarpic Fruit Development and Floral Reversion. *Plant Physiol* **130**: 605-617.
- Argueso CT, Ferreira FJ, Kieber JJ. 2009a. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant, Cell & Environment* **32**: 1147-1160.
- Argueso CT, Ferreira FJ, Kieber JJ. 2009b. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell Environ* **32**: 1147-1160.
- Bainbridge K, Guyomarc'h S, Bayer E, Swarup R, Bennett M, Mandel T, Kuhlemeier C. 2008. Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes & development* **22**: 810-823.
- Balasubramanian S, Schneitz K. 2000. NOZZLE regulates proximal-distal pattern formation, cell proliferation and early sporogenesis during ovule development in Arabidopsis thaliana. *Development (Cambridge, England)* **127**: 4227-4238.
- . 2002. NOZZLE links proximal-distal and adaxial-abaxial pattern formation during ovule development in Arabidopsis thaliana. *Development (Cambridge, England)* **129**: 4291-4300.
- Bargel H, Spatz HC, Speck T, Neinhuis C. 2004. Two-Dimensional Tension Tests in Plant Biomechanics - Sweet Cherry Fruit Skin as a Model System. *Plant Biology* **6**: 432-439.
- Bastian R, Dawe A, Meier S, Ludidi N, Bajic VB, Gehring C. 2010. Gibberellic acid and cGMP-dependent transcriptional regulation in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav* **5**: 224-232.
- Bechtold N, Pelletier G. 1998. In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **82**: 259-266.
- Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, Friml J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**: 591-602.
- Beraldi D, Picarella ME, Soressi GP, Mazzucato A. 2004. Fine mapping of the parthenocarpic fruit (pat) mutation in tomato. *Theor Appl Genet* **108**: 209-216.

- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN. 2003. A Gene Expression Map of the Arabidopsis Root. *Science (New York, NY)* **302**: 1956-1960.
- Bombarely A, Menda N, Teclé IY, Buels RM, Strickler S, Fischer-York T, Pujar A, Leto J, Gosselin J, Mueller LA. 2011. The Sol Genomics Network (solgenomics.net): growing tomatoes using Perl. *Nucleic acids research* **39**: D1149-D1155.
- Brewbaker JK, Kwack BH. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany*.
- Bünger-Kibler S, Bangerth F. 1982. Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regulation* **1**: 143-154.
- Cai X, Zhang Y, Zhang C, Zhang T, Hu T, Ye J, Zhang J, Wang T, Li H, Ye Z. 2013. Genome-wide analysis of plant-specific Dof transcription factor family in tomato. *J Integr Plant Biol* **55**: 552-566.
- Campbell NA, Lawrence GM, Jane BR. 2001. Biología. Conceptos y relaciones. in 3ª edición. Prentice Hall, Mexico.
- Caño-Delgado A, Lee J-Y, Demura T. 2010. Regulatory Mechanisms for Specification and Patterning of Plant Vascular Tissues. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **26**: 605-637.
- Capron A, Chatfield S, Provart N, Berleth T. 2009. Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **7**: e0126.
- Carmi N, Salts Y, Dedicova B, Shabtai S, Barg R. 2003. Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the rolB gene in the ovary. *Planta* **217**: 726-735.
- Carrera E, Ruiz-Rivero O, Peres LEP, Atares A, Garcia-Martinez JL. 2012. Characterization of the procerca Tomato Mutant Shows Novel Functions of the SIDELLA Protein in the Control of Flower Morphology, Cell Division and Expansion, and the Auxin-Signaling Pathway during Fruit-Set and Development. *Plant Physiology* **160**: 1581-1596.
- Ceccato L, Masiero S, Sinha Roy D, Bencivenga S, Roig-Villanova I, Ditengou FA, Palme K, Simon R, Colombo L. 2013. Maternal Control of PIN1 Is Required for Female Gametophyte Development in Arabidopsis. *PLoS ONE* **8**: e66148.
- Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. 2008. The zinc finger network of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**: 1150-1160.
- Corrales A-R, Nebauer SG, Carrillo L, Fernández-Nohales P, Marqués J, Renau-Morata B, Granell A, Pollmann S, Vicente-Carbajosa J, Molina R-V *et al.* 2014. Characterization of tomato Cycling Dof Factors reveals conserved and new functions in the control of flowering time and abiotic stress responses. *Journal of Experimental Botany* **65**: 995-1012.
- Costantini E, Landi L, Silvestroni O, Pandolfini T, Spena A, Mezzetti B. 2007. Auxin Synthesis-Encoding Transgene Enhances Grape Fecundity. *Plant Physiology* **143**: 1689-1694.
- Chaabouni S, Jones B, Delalande C, Wang H, Li Z, Mila I, Frasse P, Latché A, Pech J-C, Bouzayen M. 2009. SI-IAA3, a tomato Aux/IAA at the crossroads of auxin and ethylene signalling involved in differential growth. *Journal of Experimental Botany*.
- Chamarro J. 1995. *Anatomía y Fisiología de la Planta*. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, Barcelona, México.

- Chamarro J. 2001. Anatomía y Fisiología de la Planta. in *El cultivo del Tomate* (ed. MUNDI-PRENSA), Madrid, Barcelona, Mexico.
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y. 2006. Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes & development* **20**: 1790-1799.
- Cheng Y, Zhao Y. 2007. A Role for Auxin in Flower Development. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**: 99-104.
- Chevalier É, Loubert-Hudon A, Zimmerman EL, Matton DP. 2011. Cell-cell communication and signalling pathways within the ovule: from its inception to fertilization. *New Phytologist* **192**: 13-28.
- Christensen CA, King EJ, Jordan JR, Drews GN. 1997. Megagametogenesis in Arabidopsis wild type and the Gf mutant. *Sex Plant Reprod* **10**: 49-64.
- Daviere JM, Achard P. 2013. Gibberellin signaling in plants. *Development (Cambridge, England)* **140**: 1147-1151.
- de Jong M, Mariani C, Vriezen WH. 2009a. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1523-1532.
- de Jong M, Wolters-Arts M, Feron R, Mariani C, Vriezen WH. 2009b. The Solanum lycopersicum auxin response factor 7 (SIARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *The Plant Journal* **57**: 160-170.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445.
- Diaz I, Vicente-Carbajosa J, Abraham Z, Martinez M, Isabel-La Moneda I, Carbonero P. 2002. The GAMYB protein from barley interacts with the DOF transcription factor BPBF and activates endosperm-specific genes during seed development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **29**: 453-464.
- Dill A, Jung H-S, Sun T-p. 2001. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 14162-14167.
- Dorcey E, Urbez C, Blazquez MA, Carbonell J, Perez-Amador MA. 2009. Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **58**: 318-332.
- Drews GN, Yadegari R. 2002. Development and function of the angiosperm female gametophyte. *Annual Review of Genetics* **36**: 99-124.
- Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig L, Moreno V. 2003. The ploidy level of transgenic plants in Agrobacterium-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **106**: 231-238.
- Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T. 2000. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nature biotechnology* **18**: 784-788.
- Esau K. 1976. Anatomía Vegetal. *Ediciones Omega, Barcelona*.
- Farabee M. 2001. Flowering Plant Reproduction: Fertilization and Fruits. in *The Online Biology Book* (ed. EMC College), Arizona.

- Ficcadenti N, Sestili S, Pandolfini T, Cirillo C, Rotino GL, Spena A. 1999. Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Molecular Breeding* **5**: 463-470.
- Foolad MR. 2007. Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics* **2007**.
- Fos M, Nuez F, García-Martínez JL. 2000. The Gene *pat-2*, Which Induces Natural Parthenocarpy, Alters the Gibberellin Content in Unpollinated Tomato Ovaries. *Plant Physiology* **122**: 471-480.
- Fos M, Proaño K, Nuez F, García-Martínez JL. 2001. Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiologia Plantarum* **111**: 545-550.
- Galbiati F, Sinha Roy D, Simonini S, Cucinotta M, Ceccato L, Cuesta C, Simaskova M, Benkova E, Kamiuchi Y, Aida M *et al.* 2013. An integrative model of the control of ovule primordia formation. *The Plant Journal* **76**: 446-455.
- García-Hurtado N, Carrera E, Ruiz-Rivero O, López-Gresa MP, Hedden P, Gong F, García-Martínez JL. 2012. The characterization of transgenic tomato overexpressing gibberellin 20-oxidase reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration of the gibberellin biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany* **63**: 5803-5813.
- Gardiner J, Sherr I, Scarpella E. 2010. Expression of DOF genes identifies early stages of vascular development in Arabidopsis leaves. *International Journal of Development Biology* **54**: 1389-1396.
- Geldner N, Richter S, Vieten A, Marquardt S, Torres-Ruiz RA, Mayer U, Jürgens G. 2004. Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)* **131**: 389-400.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W. 1993. Fruits: A Developmental Perspective. *The Plant cell* **5**: 1439-1451.
- Giovannoni JJ. 2004. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The Plant cell* **16**: S170-180.
- Goetz M, Hooper LC, Johnson SD, Rodrigues JCM, Vivian-Smith A, Koltunow AM. 2007. Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato. *Plant Physiology* **145**: 351-366.
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM. 2006. AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. *The Plant cell* **18**: 1873-1886.
- Gómez P, Jamilena M, Capel J, Zurita S, Angosto T, Lozano R. 1999. *Stamenless*, a tomato mutant with homeotic conversions in petals and stamens. *Planta* **209**: 172-179.
- Gorguet B, Eggink PM, Ocana J, Tiwari A, Schipper D, Finkers R, Visser RGF, van Heusden AW. 2008. Mapping and characterization of novel parthenocarpy QTLs in tomato. *Theor Appl Genet* **116**: 755-767.
- Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P. 2005. Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biology* **7**: 131-139.
- Gualberti G, Papi M, Bellucci L, Ricci I, Bouchez D, Camilleri C, Costantino P, Vittorioso P. 2002. Mutations in the Dof Zinc Finger Genes DAG2 and DAG1 Influence with Opposite Effects the Germination of Arabidopsis Seeds. *The Plant Cell Online* **14**: 1253-1263.

- Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV. 1995. Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *The Plant Cell Online* **7**: 1879-1891.
- Guillon F, Philippe S, Bouchet B, Devaux M-F, Frasse P, Jones B, Bouzayen M, Lahaye M. 2008. Down-regulation of an Auxin Response Factor in the tomato induces modification of fine pectin structure and tissue architecture. *Journal of Experimental Botany* **59**: 273-288.
- Guo Y, Qin G, Gu H, Qu L-J. 2009. Dof5.6/HCA2, a Dof Transcription Factor Gene, Regulates Interfascicular Cambium Formation and Vascular Tissue Development in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **21**: 3518-3534.
- Hayter AJ. 1986. The Maximum Familywise Error Rate of Fisher's Least Significant Difference Test. *Journal of the American Statistical Association* **81**: 1000-1004.
- Hazra P, Dutta AK. 2010. Expression of Parthenocarpy in Tomato Due to Temperature and Pollination Treatment. *International Journal of Vegetable Science* **16**: 222-232.
- Hedden P, Kamiya Y. 1997. GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 431-460.
- Hedden P, Phillips AL. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* **5**: 523-530.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research* **27**: 297-300.
- Ho LC, Hewitt JD. 1986. *Fruit development*. Atherton, J.G. Rudich, J., New York.
- Jans DA, Hubner S. 1996. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiological Reviews* **76**: 651-685.
- Johkan M, Chiba T, Mitsukuri K, Yamasaki S, Tanaka H, Mishiba K-i, Morikawa T, Oda M, Yamamoto C, Ohkawa H. 2010. Seed Production Enhanced by Antiauxin in the pat-2 Parthenocarpic Tomato Mutant. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **135**: 3-8.
- Jung J, Park C. 2007. Vascular development in plants: specification of xylem and phloem tissues. *J Plant Biol* **50**: 301-305.
- Kim IS, Okubo H, Fujieda K. 1992. Endogenous levels of IAA in relation to parthenocarpy in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Scientia Horticulturae* **52**: 1-8.
- Konishi M, Yanagisawa S. 2007. Sequential activation of two Dof transcription factor gene promoters during vascular development in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**: 623-629.
- Krebs J, Mueller-Roeber B, Ruzicic S. 2010. A novel bipartite nuclear localization signal with an atypically long linker in DOF transcription factors. *Journal of Plant Physiology* **167**: 583-586.
- Kumar R, Tyagi AK, Sharma AK. 2011. Genome-wide analysis of auxin response factor (ARF) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development. *Molecular genetics and genomics : MGG* **285**: 245-260.
- Le Hir R, Bellini C. 2013. The plant-specific dof transcription factors family: new players involved in vascular system development and functioning in Arabidopsis. *Frontiers in plant science* **4**: 164.

- Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research* **30**: 325-327.
- Lewis DR, Muday GK. 2009. Measurement of auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nature protocols* **4**: 437-451.
- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA. 2004a. The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *The Plant cell* **16**: 126-143.
- Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, Pichersky E, Howe GA. 2004b. The Tomato Homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 Is Required for the Maternal Control of Seed Maturation, Jasmonate-Signaled Defense Responses, and Glandular Trichome Development. *The Plant Cell Online* **16**: 126-143.
- Lifschitz E, Brodai L, Hareven D, Hurwitz C, Prihadash A, Pnueli L, Samach A, Zamir D. 1993. Molecular mapping of flower development in tomato. in *Molecular Biology of Tomato* (ed. J Yoder), pp. 175-184. Lancaster, PA. : Technomic Pub. Co., USA.
- Lijavetzky D, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J. 2003. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* Dof gene families. *BMC evolutionary biology* **3**: 17.
- Liu L, White MJ, MacRae TH. 1999. Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. *European journal of biochemistry / FEBS* **262**: 247-257.
- Locascio A, Blazquez MA, Alabadi D. 2013. Genomic analysis of DELLA protein activity. *Plant & cell physiology* **54**: 1229-1237.
- Lora J, Hormaza JI, Herrero M, Gasser CS. 2011. Seedless fruits and the disruption of a conserved genetic pathway in angiosperm ovule development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 5461-5465.
- Lozano R, Angosto T, Gomez P, Payan C, Capel J, Huijser P, Salinas J, Martinez-Zapater JM. 1998. Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of MADS-Box genes. *Plant Physiol* **117**: 91-100.
- Mahonen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Tormakangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T, Helariutta Y. 2006. Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science (New York, NY)* **311**: 94-98.
- Mahonen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y. 2000. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes & development* **14**: 2938-2943.
- MAPA. 1993. Métodos Oficiales de Análisis. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.
- Mapelli S, Fropa C, Torti G, Soressi GP. 1978. Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant and Cell Physiology* **19**: 1281-1288.
- Marti C, Orzaez D, Ellul P, Moreno V, Carbonell J, Granell A. 2007. Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant Journal* **52**: 865-876.
- Martí E, Gisbert C, Bishop GJ, Dixon MS, García-Martínez JL. 2006. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2037-2047.

- Martín-Trillo M, Grandío EG, Serra F, Marcel F, Rodríguez-Buey ML, Schmitz G, Theres K, Bendahmane A, Dopazo H, Cubas P. 2011. Role of tomato BRANCHED1-like genes in the control of shoot branching. *The Plant Journal* **67**: 701-714.
- Martinelli F, Uratsu SL, Reagan RL, Chen Y, Tricoli D, Fiehn O, Rocke DM, Gasser CS, Dandekar AM. 2009. Gene regulation in parthenocarpic tomato fruit. *J Exp Bot* **60**: 3873-3890.
- Martínez-Bello L. 2014. Estudio del papel de los enzimas de catabolismo GA 2-oxidasas en el desarrollo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). in *Departamento de Biotecnología*. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Martinez E. 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant molecular biology* **50**: 925-947.
- Matsuo S, Kikuchi K, Fukuda M, Honda I, Imanishi S. 2012. Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany* **63**: 5569-5579.
- Mazzucato A, Taddei AR, Soressi GP. 1998. The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development (Cambridge, England)* **125**: 107-114.
- McCormick S. 2004. Control of Male Gametophyte Development. *The Plant Cell Online* **16**: S142-S153.
- Medina M. 2010. Androesterilidad ligada a la obtención de frutos partenocárpicos en cultivares comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). in *Departamento de Biotecnología* Universidad Politécnica de Valencia Valencia.
- Medina M, Roque E, Pineda B, Cañas L, Rodríguez-Concepción M, Beltrán JP, Gómez-Mena C. 2013. Early anther ablation triggers parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biotechnology Journal* **11**: 770-779.
- Mena Ma, Cejudo FJ, Isabel-Lamoneda I, Carbonero P. 2002. A Role for the DOF Transcription Factor BPBF in the Regulation of Gibberellin-Responsive Genes in Barley Aleurone. *Plant Physiology* **130**: 111-119.
- Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y, Zamir D. 2004. In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **38**: 861-872.
- Mezzetti B, Landi L, Pandolfini T, Spena A. 2004. The defH9-iaaM auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnol* **4**.
- Moreno-Risueno MA, Martinez M, Vicente-Carbajosa J, Carbonero P. 2007. The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. *Molecular genetics and genomics : MGG* **277**: 379-390.
- Mounet F, Moing A, Garcia V, Petit J, Maucourt M, Deborde C, Bernillon Sp, Le Gall Gnl, Colquhoun I, Defernez M *et al.* 2009. Gene and Metabolite Regulatory Network Analysis of Early Developing Fruit Tissues Highlights New Candidate Genes for the Control of Tomato Fruit Composition and Development. *Plant Physiology* **149**: 1505-1528.
- Mounet F, Moing A, Kowalczyk M, Rohrmann J, Petit J, Garcia V, Maucourt M, Yano K, Deborde C, Aoki K *et al.* 2012. Down-regulation of a single auxin efflux transport protein in tomato induces precocious fruit development. *Journal of Experimental Botany*.

- Nishio S, Moriguchi R, Ikeda H, Takahashi H, Takahashi H, Fujii N, Guilfoyle TJ, Kanahama K, Kanayama Y. 2010. Expression analysis of the auxin efflux carrier family in tomato fruit development. *Planta* **232**: 755-764.
- Noguero M, Atif RM, Ochatt S, Thompson RD. 2013. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **209**: 32-45.
- Nuez F, Costa J, Cuartero J. 1986. Genetics of the parthenocarpy for tomato varieties sub-arctic plenty, 75/59 and severianin. *Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung-Journal of Plant Breeding* **96(3)**: 200-206.
- Olimpieri I, Siligato F, Caccia R, Mariotti L, Ceccarelli N, Soressi GP, Mazzucato A. 2007. Tomato fruit set driven by pollination or by the *parthenocarpic fruit* allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta* **226**: 877-888.
- Olszewski N, Sun T-p, Gubler F. 2002. Gibberellin Signaling: Biosynthesis, Catabolism, and Response Pathways. *The Plant Cell Online* **14**: S61-S80.
- Ozga J, Reinecke D. 2003. Hormonal Interactions in Fruit Development. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**: 73-81.
- Pandolfini T, Molesini B, Spena A. 2007. Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends in Plant Science* **12**: 327-329.
- Papi M, Sabatini S, Altamura MM, Hennig L, Schafer E, Costantino P, Vittorioso P. 2002. Inactivation of the phloem-specific Dof zinc finger gene DAG1 affects response to light and integrity of the testa of Arabidopsis seeds. *Plant Physiol* **128**: 411-417.
- Park DH, Lim PO, Kim JS, Cho DS, Hong SH, Nam HG. 2003. The Arabidopsis COG1 gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **34**: 161-171.
- Pattison RJ, Catalá C. 2012. Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the PIN and AUX/LAX gene families. *The Plant Journal* **70**: 585-598.
- Pattison RJ, Csukasi F, Catala C. 2014. Mechanisms regulating auxin action during fruit development. *Physiol Plant* **151**: 62-72.
- Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ. 2009. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* **14**: 399-408.
- Petrášek J, Friml J. 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development (Cambridge, England)* **136**: 2675-2688.
- Philouze J. 1983. Parthenocarpie naturelle chez la tomate. I. Revue bibliographique. *Agronomie* **1983;3:311-320** **3**: 311-320.
- Philouze J, Maisonneuve B. 1978. Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the Soviet variety Severianin. . *Tomato Genet Coop* **28**: 12-13.
- Picken AJF. 1984. A Review of Pollination and Fruit Set in the Tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.). *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **59**: 1-14
- Pnueli L, Abu-Abeid M, Zamir D, Nacken W, Schwarz-Sommer Z, Lifschitz E. 1991. The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **1**: 255-266.

- Pnueli L, Hareven D, Broday L, Hurwitz C, Lifschitz E. 1994. The TM5 MADS Box Gene Mediates Organ Differentiation in the Three Inner Whorls of Tomato Flowers. *The Plant cell* **6**: 175-186.
- Quinet M, Bataille G, Dobrev PI, Capel C, Gómez P, Capel J, Lutts S, Motyka V, Angosto T, Lozano R. 2014. Transcriptional and hormonal regulation of petal and stamen development by STAMENLESS, the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) orthologue to the B-class APETALA3 gene. *Journal of Experimental Botany*.
- Rebers M, Kaneta T, Kawaide H, Yamaguchi S, Yang Y-Y, Imai R, Sekimoto H, Kamiya Y. 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *The Plant Journal* **17**: 241-250.
- Ren Z, Li Z, Miao Q, Yang Y, Deng W, Hao Y. 2011. The auxin receptor homologue in *Solanum lycopersicum* stimulates tomato fruit set and leaf morphogenesis. *Journal of Experimental Botany*.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR *et al.* 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science (New York, NY)* **290**: 2105-2110.
- Rieu I, Eriksson S, Powers SJ, Gong F, Griffiths J, Woolley L, Benlloch R, Nilsson O, Thomas SG, Hedden P *et al.* 2008. Genetic Analysis Reveals That C19-GA 2-Oxidation Is a Major Gibberellin Inactivation Pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **20**: 2420-2436.
- Roque E, Gómez M, Ellul P, Wallbraun M, Madueño F, Beltrán J-P, Cañas L. 2007. The PsEND1 promoter: a novel tool to produce genetically engineered male-sterile plants by early anther ablation. *Plant Cell Reports* **26**: 313-325.
- Ross JJ, O'Neill DP, Wolbang CM, Symons GM, Reid JB. 2001. Auxin-Gibberellin Interactions and Their Role in Plant Growth. *Journal of Plant Growth Regulation* **20**: 336-353.
- Rotino G, Acciarri N, Sabatini E, Mennella G, Lo Scalzo R, Maestrelli A, Molesini B, Pandolfini T, Scalzo J, Mezzetti B *et al.* 2005. Open field trial of genetically modified parthenocarpic tomato: seedlessness and fruit quality. *BMC Biotechnol* **5**: 1-8.
- Rotino GL, Perri E, Zottini M, Sommer H, Spena A. 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nat Biotech* **15**: 1398-1401.
- Ruan Y-L, Patrick JW, Bouzayen M, Osorio S, Fernie AR. 2012. Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends in Plant Science* **17**: 656-665.
- Sakakibara H. 2006. CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 431-449.
- Scott J, Harbaugh B. 1989. Micro-Tom. A miniature dwarf tomato. pp. 1-6. Florida Agricultural Experimental Station
- Schiefthaler U, Balasubramanian S, Sieber P, Chevalier D, Wisman E, Schneitz K. 1999. Molecular analysis of NOZZLE, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 11664-11669.
- Schwechheimer C, Zourelidou M, Bevan MW. 1998. PLANT TRANSCRIPTION FACTOR STUDIES. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 127-150.

- Serrani J, Fos M, Atarés A, García-Martínez J. 2007a. Effect of Gibberellin and Auxin on Parthenocarpic Fruit Growth Induction in the cv Micro-Tom of Tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**: 211-221.
- Serrani JC, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Gallego-Giraldo L, Peres LEP, García-Martínez JL. 2010. Inhibition of Auxin Transport from the Ovary or from the Apical Shoot Induces Parthenocarpic Fruit-Set in Tomato Mediated by Gibberellins. *Plant Physiology* **153**: 851-862.
- Serrani JC, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez JL. 2008. Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant Journal*.
- Serrani JC, Sanjuan R, Ruiz-Rivero O, Fos M, Luis Garcia-Martinez J. 2007b. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiology (Rockville)* **145**: 246-257.
- Seymour DK, Filiault DL, Henry IM, Monson-Miller J, Ravi M, Pang A, Comai L, Chan SWL, Maloof JN. 2012. Rapid creation of Arabidopsis doubled haploid lines for quantitative trait locus mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Shirasawa K, Hirakawa H. 2013. DNA marker applications to molecular genetics and genomics in tomato. *Breeding science* **63**: 21-30.
- Skirycz A, Radziejwoski A, Busch W, Hannah MA, Czeszejko J, Kwasniewski M, Zanor MI, Lohmann JU, De Veylder L, Witt I *et al.* 2008. The DOF transcription factor OBP1 is involved in cell cycle regulation in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **56**: 779-792.
- Smulders MJM, Rus-Kortekaas W, Gilissen LJW. 1994. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science* **97**: 53-60.
- Song C, Guo J, Sun W, Wang Y. 2012. Whole Genome Duplication of Intra- and Inter-chromosomes in the Tomato Genome. *Journal of Genetics and Genomics* **39**: 361-368.
- Soressi G, Salamini F. 1975. A monomendelian gene inducing parthenocarpic fruits. *Tomato Genetic Cooperative Reports* **25**: 22.
- Sotelo-Silveira M, Marsch-Martinez N, de Folter S. 2014. Unraveling the signal scenario of fruit set. *Planta* **239**: 1147-1158.
- Sponsel V, Hedden V. 2004. Gibberellin biosynthesis and inactivation. in *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (ed. PJ Davies), pp. 63-94. Kluwer Acad Pub, The Netherlands.
- Srivastava A, Handa AK. 2005. Hormonal regulation of tomato fruit development: A molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**: 67-82.
- Sundberg E, Ostergaard L. 2009. Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**: a001628.
- Swarup K, Benkova E, Swarup R, Casimiro I, Peret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S *et al.* 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature cell biology* **10**: 946-954.
- Talón M. 2000. Giberelinas. in *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (ed. IMG Hill), pp. 325-341. Azcón-Bieto, J. , España.

- Tanaka M, Takahata Y, Nakayama H, Nakatani M, Tahara M. 2009. Altered carbohydrate metabolism in the storage roots of sweet potato plants overexpressing the SRF1 gene, which encodes a Dof zinc finger transcription factor. *Planta* **230**: 737-746.
- Tomato-Genome-Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635-641.
- Vanneste S, Friml J. 2009. Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**: 1005-1016.
- Vardy E, Lapushner D, Genizi A, Hewitt J. 1989. Genetics of parthenocarpy in tomato under a low temperature regime: II Cultivar 'Severianin'. *Euphytica* **41**: 9-15.
- Varga A, Bruinsma J. 1986. Tomato. in *Handbook of Fruit Set and Development* (ed. MS (ed)), pp. 461-480., Boca Raton FL CRC Press.
- Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P. 2000. Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends in Biotechnology* **18**: 233-242.
- Vidal AM, Ben-Cheikh W, Talon M, Garcia-Martinez JL. 2003. Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta* **217**: 442-448.
- Vivian-Smith A, Luo M, Chaudhury A, Koltunow A. 2001. Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)* **128**: 2321-2331.
- Vrebalov J, Pan IL, Arroyo AJM, McQuinn R, Chung M, Poole M, Rose J, Seymour G, Grandillo S, Giovannoni J *et al.* 2009. Fleshy Fruit Expansion and Ripening Are Regulated by the Tomato SHATTERPROOF Gene TAGL1. *The Plant Cell Online* **21**: 3041-3062.
- Vriezen WH, Feron R, Maretto F, Keijman J, Mariani C. 2008. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist* **177**: 60-76.
- Wang H, Jones B, Li ZG, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latche A, Pech JC, Bouzayen M. 2005. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *The Plant cell* **17**: 2676-2692.
- Wang HW, Zhang B, Hao YJ, Huang J, Tian AG, Liao Y, Zhang JS, Chen SY. 2007. The soybean Dof-type transcription factor genes, GmDof4 and GmDof11, enhance lipid content in the seeds of transgenic Arabidopsis plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **52**: 716-729.
- Wang Y, Tang X, Cheng Z, Mueller L, Giovannoni J, Tanksley SD. 2006. Euchromatin and Pericentromeric Heterochromatin: Comparative Composition in the Tomato Genome. *Genetics* **172**: 2529-2540.
- Ward JM, Cufre CA, Denzel MA, Neff MM. 2005. The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in Arabidopsis. *The Plant cell* **17**: 475-485.
- Wasternack C, Forner S, Strnad M, Hause B. 2013. Jasmonates in flower and seed development. *Biochimie* **95**: 79-85.
- Wei PC, Tan F, Gao XQ, Zhang XQ, Wang GQ, Xu H, Li LJ, Chen J, Wang XC. 2010. Overexpression of AtDOF4.7, an Arabidopsis DOF family transcription factor, induces floral organ abscission deficiency in Arabidopsis. *Plant Physiol* **153**: 1031-1045.

- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T. 2003. Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *The Plant Cell Online* **15**: 2532-2550.
- Werner T, Schmülling T. 2009. Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 527-538.
- Wilson LA, Sterling C. 1976. *Studies on the cuticle of tomato fruit. I. Fine structure of the cuticle. Z.*
- Wiśniewska J, Xu J, Seifertová D, Brewer PB, Růžička K, Blilou I, Rouquié D, Benková E, Scheres B, Friml J. 2006. Polar PIN Localization Directs Auxin Flow in Plants. *Science (New York, NY)* **312**: 883.
- Yamaguchi S. 2008. Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 225-251.
- Yanagisawa S. 1995. A novel DNA-binding domain that may form a single zinc finger motif. *Nucleic acids research* **23**: 3403-3410.
- . 1997. Dof DNA-Binding Domains of Plant Transcription Factors Contribute to Multiple Protein-Protein Interactions. *European Journal of Biochemistry* **250**: 403-410.
- . 2000. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *The Plant Journal* **21**: 281-288.
- . 2001. The Transcriptional Activation Domain of the Plant-Specific Dof1 Factor Functions in Plant, Animal, and Yeast Cells. *Plant and Cell Physiology* **42**: 813-822.
- . 2002. The Dof family of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* **7**: 555-560.
- . 2004. Dof Domain Proteins: Plant-Specific Transcription Factors Associated with Diverse Phenomena Unique to Plants. *Plant and Cell Physiology* **45**: 386-391.
- Yanagisawa S, Izui K. 1993. Molecular cloning of two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif. *The Journal of biological chemistry* **268**: 16028-16036.
- Yanagisawa S, Sheen J. 1998. Involvement of Maize Dof Zinc Finger Proteins in Tissue-Specific and Light-Regulated Gene Expression. *The Plant Cell Online* **10**: 75-89.
- Yang J, Yang M-F, Zhang W-P, Chen F, Shen S-H. 2011. A putative flowering-time-related Dof transcription factor gene, JcDof3, is controlled by the circadian clock in *Jatropha curcas*. *Plant Science* **181**: 667-674.
- Yang W-C, Sundaresan V. 2000a. Genetics of gametophyte biogenesis in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 53-57.
- Yang WC, Sundaresan V. 2000b. Genetics of gametophyte biogenesis in Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 53-57.
- Yang WC, Ye D, Xu J, Sundaresan V. 1999. The SPOROCTELESS gene of Arabidopsis is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes & development* **13**: 2108-2117.
- Yao J-L, Dong Y-H, Morris BAM. 2001. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 1306-1311.

- Yin Z, Malinowski R, Ziolkowska A, Sommer H, Plcader W, Malepszy S. 2006. The DefH9-iaaM-containing construct efficiently induces parthenocarpy in cucumber. *Cellular & molecular biology letters* **11**: 279-290.
- Yu H, Ito T, Zhao Y, Peng J, Kumar P, Meyerowitz EM. 2004. Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 7827-7832.
- Zhang B, Chen W, Foley RC, Buttner M, Singh KB. 1995. Interactions between Distinct Types of DNA Binding Proteins Enhance Binding to ocs Element Promoter Sequences. *The Plant Cell Online* **7**: 2241-2252.

VIII. ANEXOS


```

873 ATCTTTAATT-----AATAAGTAATTAC-----TATT----- 900 S1DOF10
821 AACCAATTTTGTCCAAAATTTGGAGATTTCGTCGTCGAAACAACAAGAAGATCATCAAG 880 S1DOF31
   *:*  ::::**          ***:* *.:**:*          *::

901 TTACTATTAGGG-----TGAAGGGTGCATGAGATGTTTGTGGTAT--ACT--GGGGATAC 951 S1DOF10
881 AAACATTTGGAAATAACAATGTTGATTCAAGAAAAGATTGTAGTACTACTATTGGAAATC 940 S1DOF31
   :***:**.*..      : .: *. * **:***.*:*:***.* **  ***  **.*:~*

952 TTGGACATGGGTG-----TG--GCTTAGATTT--TA--TTTGTTTTATT 990 S1DOF10
941 ---ATCATGGGAACAATTTATCAACTGAATGGTCTTTTGATAACTCATTGGTTTAAATT 997 S1DOF31
   .:*****:.          **  ***:***:*  * **  *****:***

991 CTG-TTTTCTCTTTGCTTTTGTGTGTTTCATCTATAAAAAT-----C----AAT 1038 S1DOF10
998 CAAATTC AACACATAGCAACAACA---ACAACAACAATGGGAATGGAAATGCAAATGAT 1053 S1DOF31
   *:. **  :::*:**:**:~*:: : : . :~*:*:**:~*...***  *  .**

1039 GTACTAAATTT-----ATTTTC----- 1056 S1DOF10
1054 GATCAAATGTCAACAATTGGAATAGTACTATTCAAGCTTGGAGCAATTTGAATCAATAT 1113 S1DOF31
   *:*:**:** *          *  *:**

1057 ----- 1056 S1DOF10
1114 AGTACACTACCTAA 1128 S1DOF31

```

Tabla suplementaria 1. Proteínas utilizadas para la elaboración del árbol filogenético. Se muestra el número de referencia de acuerdo al GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Proteína	Referencia GenBank
S1DOF10	XP_004232062.1
StDOF	XP_006338231.1
S1DOF31	XP_004250167.1
StDOF5.7-like	XP_006353273.1
PaDOF	AAV28423.1
PtDOF	XP_002310753.1
RcDOF	XP_002522340.1
VvDOF	XP_003635142.1
GmDOF17.4	XP_003550086.1
GmDOF01.3	XP_003517276.1
MdDOF	ADL36685.1
AtDOF5.7	NP_201362.1
CcDOF	XP_006425821.1
VvDOF5.7-like	XP_002266518.2
RcDOF5.7-like	XP_002532379.1
GmDOF1.1	XP_003517274.1
GmDOF9.1	XP_003534250.1

AGRADECIMIENTOS

A continuación quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra manera han contribuido a la realización de esta tesis doctoral y que me han acompañado durante estos 4 años.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores Dr. José Pío Beltrán y Dra. Concha Gómez, así como al Dr. Luis Cañas. Gracias por abrirme las puertas y depositar la confianza en mí desde el primer momento, por su ayuda, su apoyo, su tiempo, su sabiduría y el pragmatismo con el que han abordado las diferentes etapas de esta investigación.

Especialmente quiero agradecer a Concha porque además de ser mi directora es mi amiga. Gracias Concha por tu infinita paciencia, tu sensatez, tus consejos, tu aprecio y por brindarme la mano en los momentos más difíciles. Fuiste sin duda una persona importante en mi trayectoria por España, a nivel personal y profesional.

También doy gracias y hago un reconocimiento a Mónica Medina, por sus numerosos aportes en conocimiento y trabajo para la presente tesis doctoral. En especial por la obtención de las líneas transgénicas utilizadas en caracterización funcional del gen SIDOF10.

Así mismo, agradezco infinitamente a Rafa por su ardua y eficaz labor en el invernadero, pues sin su sabiduría y trabajo nada de esto hubiera sido posible.

Agradezco también la concesión de la beca STSM (Short-Term Scientific Missions) concedida por el COST (European Cooperation in Science and Technology). Al Dr. Thomas Dresselhaus, por acogerme en su laboratorio del departamento de biología celular y bioquímica de plantas, en la Universidad de Regensburg (Alemania). A mi supervisora, Dra. Junyi Chen por transmitirme su conocimiento y su ayuda durante mi estancia.

A mi amiga Sandra Bertrand y su familia. Por su compañía, su candidez, su generosidad, sus detalles, por darme la oportunidad de conocer a su lado la cultura alemana y brindarme el cariño que me hizo sentir como si estuviera en mi hogar.

A mis compañeros y amigos del laboratorio y la hora del café: Mari Cruz, Edelín, Mónica, Roberto, Marisol y MD. Gracias por la ayuda, el apoyo y la amistad que me brindan, por compartir conmigo día a día las historias, las experiencias, las tácticas, entre otras cosas que se me escapan en este momento. Aprendí mucho de cada uno de ustedes y estoy segura que todo esto me servirá en un futuro. Para mí fueron una fuente de alegría y entusiasmo cada mañana.

A la Fresquet y la Hamza, por su compañía, las discusiones, los consejos, “las puñetas”, las comidas (para mi almuerzos) y sobretodo por soportarme, especialmente en la última etapa de escritura de tesis.

A toda mi familia española y miembros de la “ONU”. Empezando por mis hermanas: Lili, Eszter, Lore y Rim. Gracias por brindarme su apoyo incondicional, por sus locuras, por entenderme y por tantas cosas bonitas que hicieron para verme feliz en los días importantes (por don tomate y el señor Gómez). A Carla Marie, por estar siempre pendiente de mí, por las tartas de cumpleaños y por acompañarme en la distancia. A Carito, Gerry, Pablo, Pepe, Víctor, Mariana, Priscila, Afri, Cris y a toda la gente que ha compartido con nosotros momentos inolvidables. Me reiré recordando las tardes de cervezas, las cenas, los regalos inesperados (Gerry), las risas, los chistes, y como no decirlo “El trabuco”.

Agradezco también a todas las personas del IBMCP que de una u otra manera estuvieron presentes cuando necesitaba ayuda, entre ellas a Majo y Ana Berbel.

A las personas que convivieron con nosotros estos cuatro años, en especial a Camilla, Aga y Leo por la armonía que nos brindaron en el tiempo que estuvimos juntos.

A mis amigos y amigas del Orfeón Universitario de Valencia, por integrarme como una valenciana mas, y por darme la oportunidad de vincularme a esa gran familia musical.

A mis amigas y amigos en Colombia que desde el principio me apoyaron y continúan haciéndolo en la distancia.

En fin, aunque no los nombre a todos, gracias a todas las personas que me acompañaron en esta temporada.

Finalmente quiero agradecer a quienes dedico esta tesis:

A mi familia, mis padres, Avilio y Myriam, y mis hermanos, Angélica y Ernesto. De quienes he aprendido que con empeño y amor todo se puede conseguir, de quienes recibo diariamente el apoyo emocional y espiritual. Gracias por el esfuerzo, por sus voces de aliento y por creer en mí a cada instante. Han sido mi inspiración y a ustedes debo todos mis logros.

A mis abuelitos Elvita y Avilio, y a mi Rebe que desde el cielo me acompaña desde hace un año y medio. A Yaneth, Gloria, Jenny, Anita, Laura y toda mi familia por la ayuda y la energía que me envían diariamente.

A Juan Camilo, mi compañero, mi amigo, mi confidente y principal cómplice de esta aventura. Gracias por tu apoyo, por tu confianza, por tu amor, por abrirme las puertas de tu vida y permitirme caminar a tu lado.