

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## INTERACCIÓN ENTRE GIBERELINAS Y AUXINAS EN TOMATE Micro-Tom

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Felipe Jiménez Hernández

TUTOR: Ramón Serrano

COTUTORA: Isabel López Díaz

*Curso Académico: 2014/2015*

**VALENCIA, 01/09/2015**

Reserva de todos los derechos

**Autor del TFG:** Felipe Jiménez Hernández

**Título del TFG:** Interacción entre giberelinas y auxinas en tomate Micro-Tom

**Localidad y fecha:** Valencia, 01/09/2015

**Tutor académico:** Ramón Serrano

**Cotutor/a:** Isabel López

## Resumen

Existen diferentes hipótesis sobre cómo las hormonas vegetales influyen entre sí. En el presente trabajo se hace un estudio sobre cómo la presencia de giberelinas puede influir en la síntesis y acción de las auxinas en líneas de tomate *Micro-Tom*. Para ello se han utilizado distintas líneas en las cuales la síntesis de giberelinas ha sido modificada, bien sobreexpresando la enzima 20-oxidasa en la línea 20ox provocando una presencia mayor de giberelinas, silenciando los genes que codifican el represor DELLA en la línea Pro, lo cual hará que la respuesta a giberelinas este activada constitutivamente, o silenciando los genes que codifican la enzima 2-oxidasa, encargada de la desactivación de las giberelinas activas en las líneas L1. Utilizando estas, vamos a cuantificar mediante HPLC-MS/MS la cantidad de auxinas en distintas alturas del tallo para poder ver cómo las giberelinas han influido en su producción. Por otro lado, se utilizaron estas líneas para hacer un estudio de germinación, viendo que las líneas que mejor germinaron fueron las que mayor cantidad de giberelinas presentaban. También se cuantificarán los niveles de giberelinas para ver si los cambios génicos en estas líneas han sido efectivos. Para poder comprender y ver mejor cómo actúan las auxinas, se han hecho tinciones GUS en tallos modificados genéticamente mediante la construcción DR5-GUS y así poder marcar las zonas donde esté presente esta hormona en el tallo. Tras la cuantificación y las tinciones GUS se pudo ver cómo las auxinas se acumulan en el ápice del tallo principalmente. Además, las líneas que sobreexpresaban giberelinas tenían mayor cantidad de auxinas, por lo que es lógico suponer que estas tienen un papel importante en su biosíntesis.

## Palabras clave

Auxinas, Giberelinas, , Micro-tom, HPLC-MS/MS, tinción GUS

## Abstract

There are different theories about how the vegetable hormones interact between each other. This work tries to make a study about how the presence of gibberellins can affect the auxin synthesis in tomato Micro-Tom. For doing that, several tomato lines have been used in which the gibberellins synthesis has been modified. In one of this lines, the 20ox, the genes that encode the enzyme 20-oxidase have been overexpressed, so there will be more Gibberellins. In other line, named Pro, the genes that codified the repressor DELLA have been silenced. The last line that modified the gibberellins level is L1 and is characterized by the silencing of the genes that encode the enzyme 2-oxidase that deactivates the gibberellins active forms. Using this lines the auxins amount will be quantified by HPLC- MS/MS in different sections of the stem to see how gibberellins can affect in the auxin synthesis. This lines were also used in a germination study to see how gibberellins affect this process, seeing that the lines which have more amount of this hormone had a better germination. The gibberellin level of these lines was also quantified to see if the genetic changes have been completed. To see and understand better how auxins work and where they are located in the stem GUS stains were made in genetically modified tomato lines that had the DR5-GUS construction that allows to locate this hormone. After the quantification and GUS stain we could see that the auxins are accumulated in the stem apex. Finally, the lines that had more gibberellins showed a bigger amount of auxins, what make us suppose that the gibberellins have an important role in the synthesis of these hormones.

## Key words

Auxins, Gibberellins, tomato Micro-Tom, GUS stain, HPLC-MS/MS

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero dar las gracias al laboratorio de Isabel López Díaz y todos compañeros con los que he podido disfrutar en estos meses en el I.B.M.C.P., así como a todas las personas de este instituto que me han ayudado a completar este trabajo. Me gustaría resaltar en especial el buen trato que me han mostrado Isabel López, Teresa Sabater y Esther Carrera, por sus buenas maneras, su paciencia, y lo mucho que me han enseñado en estos meses. No sé lo que me deparará el futuro, pero espero terminar en un sitio donde se pueda trabajar tan cómodo y con tan buen compañerismo, muchas gracias, sinceramente. Dar las gracias también a Ramón Serrano por haber aceptado ser mi tutor de la universidad en este trabajo.

En segundo lugar quiero agradecer a todos mis amigos que me han acompañado en estos breves e inolvidables cuatro años de universidad. Con esto me refiero a mis nuevas amistades hechas en la universidad, mis viejas amistades manchegas que me han acompañado hasta aquí, así como la gente con la que he convivido en la residencia y jamás podré olvidar. Por vosotros estos cuatro años apenas han sido un parpadeo. Muchísimas gracias

Por último, y por ello más importante, tengo que agradecerle TODO a mis padres Felipe y Magdalena, mis hermanos Nico y Sofi y a toda mi familia, ya que ellos son los culpables de que sea quien soy hoy en día. Infinitas gracias les doy todos los días por lo afortunado que soy por tenerlos.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. TOMATE MICRO-TOM</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. GIBERELINAS</b> .....	<b>2</b>
1.2.1. Síntesis y señalización de las Giberelinas .....	2
1.2.2. Efectos fisiológicos de las Giberelinas .....	4
<b>1.3. AUXINAS</b> .....	<b>5</b>
1.3.1. Tipos y biosíntesis de Auxinas .....	6
1.3.2. Efecto fisiológico de las Auxinas .....	8
<b>1.4. TRANSPORTE DE AUXINAS</b> .....	<b>9</b>
<b>1.5. INTERACCIÓN ENTRE GIBERELINAS Y AUXINAS</b> .....	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1. MATERIALES</b> .....	<b>13</b>
3.1.1. Material vegetal .....	13
3.1.2. Material para el cultivo de las plantas .....	13
3.1.3. Material para la extracción y cuantificación de hormonas .....	14
3.1.3.1. Columnas empleadas en la extracción hormonal .....	14
3.1.3.2. HPLC- MS/MS .....	14
3.1.4. Soluciones para la tinción GUS .....	15
<b>3.2. MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
3.2.1. Cultivo de plantas y división del tallo .....	16
3.2.1.1. Germinación y cultivo de las plantas en invernadero .....	16
3.2.1.2. División del tallo para la cuantificación hormonal .....	17
3.2.2. Método de extracción de Auxinas y Giberelinas .....	18
3.2.3. Método de tinción GUS .....	20
<b>4. RESULTADOS Y DISCURSIÓN</b> .....	<b>21</b>
4.1. Estudio de germinación y aparición de cotiledones .....	21
4.2. Análisis de la cuantificación de IAA en Micro- Tom.....	24
4.3. Análisis de la cuantificación de giberelinas en Micro- Tom .....	26
4.3.1. Análisis de GA1 .....	27
4.3.2. Análisis de GA4 .....	28
4.3.3. Análisis de GA20 .....	28
4.3.4. Análisis de GA9 .....	29
4.4. Resultados de la tinción GUS .....	30

4.4.1. Tinción GUS de los tallos enteros de DR5 .....	30
4.4.2. Tinción GUS de los cortes transversales de las secciones del tallo ..	31
4.4.3. Tinción GUS de los cortes transversales del tallo de DR5. ....	32
5. CONCLUSIÓN .....	33
6. BIBLIOGRAFÍA .....	34

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Tomate Micro-Tom

Una vez completados los estudios de los genomas de *Oryza sativa* (arroz) y *Arabidopsis* y viendo los avances que estos han permitido en el conocimiento del comportamiento vegetal se ha demostrado que la información del genoma de las distintas especies de plantas es una herramienta muy útil. Con esta información y viendo que el estudio del *Solanum Lycopersicum.L* (tomate) no se podía completar con la información de esos dos genomas esta especie se convirtió en el siguiente objetivo del análisis génico, con el gran inconveniente de que su genoma es mayor que el de *Arabidopsis* y arroz (es una especie diploide con 24 cromosomas y 950 Mb aproximadamente frente a los 135 Mb que tiene *Arabidopsis* o los 430 Mb del arroz) (Jin Sun *et al.*, 2006). El tomate (*Solanum Lycopersicum.L*), además de ser una de los modelos principales en el estudio génico y molecular en el estudio vegetal, es uno de los frutos más importantes en la economía mundial. Esta planta, cuyas raíces se remontan a Sudamérica y Centroamérica, es de las más comercializadas en todo el mundo, siendo China con 47,116,084 toneladas el mayor productor seguido de Estados Unidos con 12,858,700 toneladas, en España la producción de tomate sólo alcanza las 3,683,600 toneladas (FAOSTAT 2015).

El *Solanum Lycopersicum.L* es una planta herbácea anual, caracterizada por formar hojas compuestas, frutos tipo baya, tener un tallo ramificado con altura variable (según las variedades) y un ciclo de vida corto, esto último sumado a la facilidad de manipular su genoma es lo que le ha convertido en un objetivo óptimo para el análisis génico. Para nuestro trabajo además es importante indicar que el tomate tiene un patrón de ramificación simpodial caracterizado por que la yema apical es la que crece limitando el crecimiento de las yemas laterales. Cuando la yema apical cesa su crecimiento debido a la formación de flores, son las ramas laterales (yemas axilares, generalmente las superiores) las que continúan el crecimiento.

El Micro-Tom es una variedad de la especie *Solanum Lycopersicum.L*, que es utilizada en el laboratorio en el análisis molecular y génico del tomate y la cual será utilizada como control en nuestro experimento. Esta variedad fue creada a partir del cruce de Florida Basket y Ohio 4013-3 con el objetivo de desarrollar una línea ornamental (Scott and Harbaugh, 1989) pero finalmente su finalidad inicial cambió. El fenotipo de esta variedad de tomate se caracteriza por presentar una altura mucho menor que la usual (alcanzando una altura de 15 cm aproximadamente), crecer con una gran densidad (1,375 plantas por m<sup>2</sup>), y que las semillas pueden crecer con luz fluorescente permitiendo la cosecha del fruto a los 70-90 días desde que fueron plantadas, facilitando su uso y manipulación en el laboratorio. Este fenotipo se debe, al menos, a dos mutaciones recesivas, una en el gen DWARF (d) y otra en el gen SELF-PRUNING (SP). El gen SP pertenece a la familia génica CETS que codifican para proteínas que regulan el crecimiento del meristemo apical, por lo que este gen controla el proceso mediante el cual los brotes vegetativos y reproductivos se alternan durante la ramificación simpodial característica del tomate. Por otro lado la mutación en el gen DWARF, que codifica la proteína P450, enzima encargada de la oxidación de 6-deoxocastasterona para formar la castasterona en la síntesis de brasinoesteroides, provocará un déficit en esta hormona. Esta hormona actúa de forma sinérgica junto con las giberelinas (GAs) por lo que al reducir la cantidad de brasinoesteroides la actividad de las GAs se ve afectada también, pese a que las mutaciones no afectan a la biosíntesis de esta hormona, siendo la causa más probable para el tamaño

reducido de esta variedad de *Solanum Lycopersicum.L.* Así mismo este fenotipo del Micro-Tom se asocia a un tercera mutación que afecta a la altura de la planta, el gen *miniature (mnt)*, pese a que esto último no ha sido demostrado. (Martí *et al.*, 2006)

## 1.2 Giberelinas

El ácido giberelico o giberelinas (GAs), perteneciente a la familia de los diterpenoides, es una de las fitohormonas más importantes, ya que es la encargada de mediar en una gran cantidad de procesos de crecimiento en las plantas como la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo del fruto, flores y semillas, así como el proceso de germinación de las semillas. (Bassel *et al.*, 2008).

### 1.2.1 Síntesis y señalización de GAs

Se han descubierto los genes responsables de la síntesis de giberelinas mediante la identificación de mutaciones en determinados genes que han provocado un fenotipo enano en la planta, pero que ha vuelto al fenotipo original tras la aplicación exógena de giberelinas (Koorneef and van der Veen,1990). La ruta de síntesis del ácido giberélico (figura 1) empieza con el compuesto genaryl genaryl difosfato (GGDP), el cual es convertido en ent-kaureno mediante la acción de dos enzimas CPS (*ent*-copalyl difosfato sintasa) y KS (*ent*- kaurene sintasa). El *ent*- kaurene es convertido en la GA12, el primer precursor GA de la ruta de síntesis mediante la acción de dos enzimas P450 asociadas a la membrana, la *ent*- kaurene oxidasa (KO) y la *ent*- kaurenoic ácido oxidasa. A partir de la GA12 existen dos posible rutas alternativas, las cuales se desarrollaran ya en el citoplasma celular, una en la que la enzima 13-oxidasa no actúa y otra caracterizada por la acción temprana de la enzima 13-oxidasa, que darán lugar a dos GAs activas diferentes, la GA4 y la GA1 respectivamente. Esta ruta de síntesis es igual para todas la plantas pero dependiendo de la especie de planta la hormona bioactiva predominante cambia, mientras que en el tomate y arroz es la GA1, en *Arabidopsis* es la GA4, esto depende de la actividad de la enzima 13-oxidasa, el por qué la 13-oxidasa es más activa en unas especies o en unos tejidos es desconocido aún (Magome *et al.*, 2012). Así mismo una vez que ha actuado y forma uno de los dos precursores (GA12 para formar GA4 o GA53 para formar la GA1) son las enzimas 20-oxidasa y 3-oxidasa las que completan el proceso de síntesis hasta formar una de las dos giberelinas activas. Este proceso de síntesis está muy regulado para que haya el nivel de hormona adecuado para completar el proceso de crecimiento y desarrollo de la planta, para ello los niveles endógenos de GAs son regulados mediante biosíntesis e inactivación. Así se han descubierto mecanismo encargados de la desactivación de la GAs, las principales enzimas encargadas de este proceso son las GA 2-oxidases, que al igual que GA 20-ox y GA 3-ox son dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato. Existen dos tipos de GA 2-oxidases dependiendo del sustrato que utilicen, por una lado están las que actúan con las GAs de 19 carbonos, lo que incluye las dos GAs bioactivas y sus precursores inmediatos (GA20 y GA9), mientras que por otro lado están las que actúan con las GAs de 20 carbonos, GA12 y GA 53 (Martínez-Bello *et al.*, 2015), el mecanismo mediante el cual la 2-oxidasa inactiva las GAs activas y sus precursores es añadir un grupo 2 $\beta$ -hidroxilo (Lee and Zeevart, 2005). Tanto la GA 20-oxidasa como la GA 3-oxidasa y la GA 2-oxidasa son codificadas por pequeñas familias génicas cuya expresión puede ser regulada (Serraní *et al.*, 2007), así aumentado la expresión de genes como SIGA20ox-1, SIGA20ox-2 y SIGA20ox-3 responsables de la formación de la 20-

oxidasa aumentara la presencia de giberelinas (Serraní *et al.*, 2008). En el caso de la 2-oxidasa se han identificado cinco familias génicas en tomate las cuales se pueden clasificar en tres subfamilias génicas, el primer y segundo grupo utiliza como sustrato las GAs de 19-C mientras que el segundo grupo utiliza las GAs de 20-C como sustrato. Por otro lado no se han podido descubrir aun los genes encargados de la regulación de la GA 13-oxidasa, siendo esta una de las mayores labores que quedan por hacer para comprender adecuadamente la síntesis de esta hormona. (Lee y Zeevart,2005)

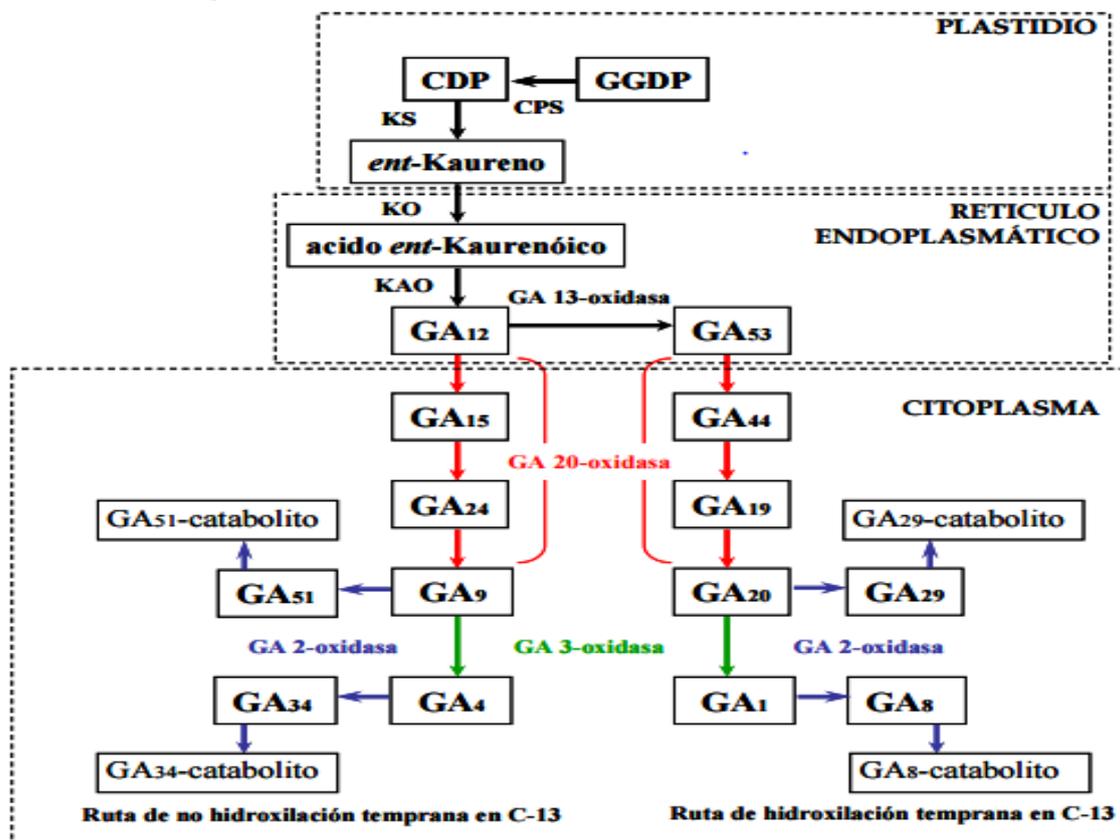
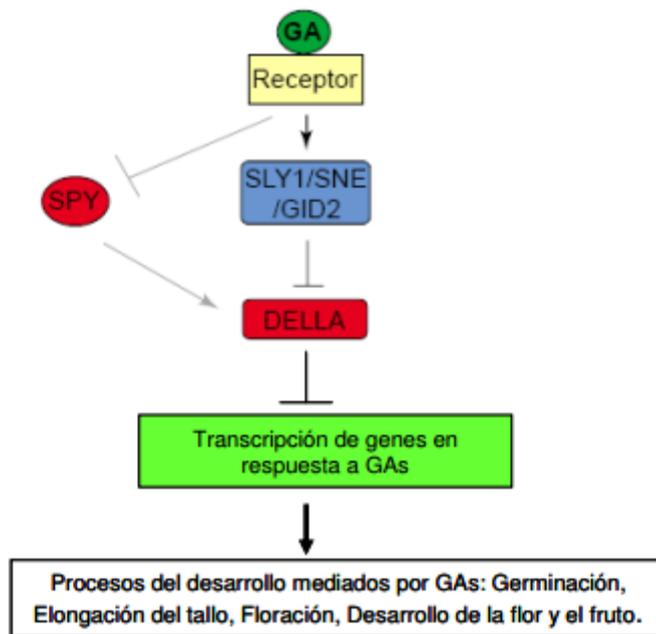


Figura 1: Ruta de síntesis del ácido giberélico (GA) en las plantas

La biosíntesis de las giberelinas está mejor caracterizada que la cascada de señalización que se desencadena tras la acción de las GAs, la cual se va conociendo mejor tras el descubrimiento del receptor soluble de GAs. Se ha identificado el gen *GID1* (GIBERELLIN INSENSITIVE DRARWF1) en arroz y *Arabidopsis* y su afinidad estructural con las GAs activas, posteriormente en estudios con levaduras se ha podido ver que se forma un complejo formado por la Gas activas-*GID1* y las proteínas DELLA (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2007). Las proteínas DELLA actúan como reguladores negativos de GAs, así cuando las giberelinas se unen al receptor las proteínas DELLAS son fosforiladas y degradadas por el proteosoma 26S, gracias a la acción de proteínas como la *SLY 1* en *Arabidopsis*. Una vez degradadas se activa la transcripción de los genes de respuesta a GAs que interviene en diversos procesos del desarrollo de la planta (figura 2). (Hare *et al.*, 2003)



**Figura 2:** Ruta de señalización del ácido giberélico tras unirse a su receptor soluble en *Arabidopsis*

Provocando mutaciones en estos reguladores negativos como DELLA, podemos inducir una respuesta constitutiva de giberelinas, como en el caso de la línea Pro que hemos utilizado en nuestra investigación, dando lugar a plantas con tallos más altos y con un patrón de ramificación menor. Así mismo existen proteínas reguladoras, las cuales pueden ejercer una regulación positiva si ayudan a degradar a DELLA o negativas si aumentan la estabilidad de la misma. Entre esos reguladores negativos podemos encontrar genes con el SPY, una N-acetilglucosamina transferasa cuya acción ayuda a estabilizar a DELLA a la hora de degradar la proteína. Por otro lado tenemos proteínas como PHOR1 que actúa como regulador positivo puesto que forma parte del complejo de ubiquitinación SCF E3 ubiquitina ligasa, encargado de la degradación de DELLA (Olszewski *et al.*, 2002)

### 1.2.2 Efectos fisiológicos de GAs

Como se ha dicho antes, el ácido giberélico interviene en una gran cantidad de procesos fisiológicos. El principal efecto que tiene esta hormona en las plantas es la inducción del crecimiento, interviniendo en multitud de procesos como la germinación, la elongación del tallo, el crecimiento de la raíz o el desarrollo de frutos y flores entre otros.

Se ha demostrado que las GAs son causantes del crecimiento del tallo puesto que los mutantes deficientes de estas hormonas son fenotípicamente más enanos, además, al añadir de forma exógena GA, se ha podido observar que el crecimiento normal se restaura (Hedden y Phillips, 2000). Esta elongación de tallo se aprecia sobre todo en los entrenudos y se da principalmente por la división y expansión celular, siendo este último el principal culpable del crecimiento del tallo. Se ha visto que las GAs provocan la división celular estimulando el paso

de las células de la fase G1 a la fase S y acortando al mismo tiempo la duración de esta última (Liu y Loy, 1976). Además, se ha comprobado que las GAs promueven el crecimiento celular incrementando la hidrólisis de almidón, sacarosa y fructanosa. Las GAs también aumentan la plasticidad de la pared celular haciendo que las células jóvenes derivadas del meristemo intercalar de los entrenudos se expandan. Finalmente las GAs podrían estar implicadas en la reorientación de los microtúbulos, hecho fundamental para determinar la polaridad de la expansión celular, proceso en el que también intervendrían las auxinas (Baluska *et al.*, 1993)

Otro de los procesos en los que están implicadas las GAs es el crecimiento de las raíces. Como se ha podido demostrar en algunos estudios con guisantes, (Yaxley *et al.*, 2001) las raíces de los mutantes con un nivel menor de GAs son más cortas que las normales, además, mediante la aplicación exógena de GAs, estas vuelven a recuperar su longitud normal. Además, se ha podido ver que el contenido de GA1, la GA activa mayoritaria en guisante, en el ápice radical es mayor que en el resto de zonas de la raíz, demostrando que esta hormona es importante en el proceso de crecimiento de la raíz puesto que, se acumula en dicha zona.

También se ha podido demostrar, y más adelante en nuestros resultados lo podremos ver, que las GAs intervienen activamente en el proceso de germinación de las semillas. Se ha podido ver cómo en muchas especies que tienen mutaciones que provocan un déficit en esta hormona sus semillas son incapaces de germinar hasta que se aplican GAs de forma exógena (Koornneef *et al.*, 1990). Cuando las GAs provocan la degradación de la proteína DELLA se activa el factor de transcripción GAMYB el cual activa la  $\alpha$ -amilasa y otras enzimas hidrolíticas encargadas de degradar el endospermo.

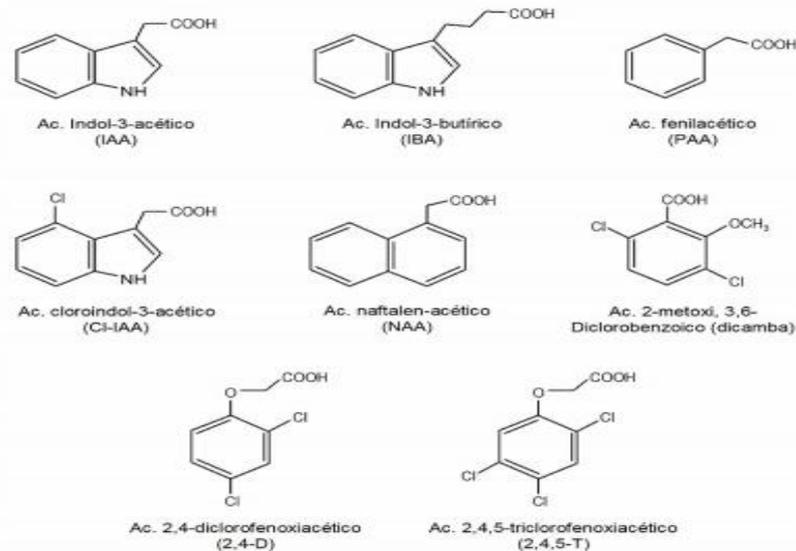
Por último, hay que destacar que las giberelinas también tienen un papel importante en la inducción de floración, aunque esto no puede generalizarse a todas las especies puesto que depende de que sea dependientes o independientes del fotoperiodo (Ross *et al.* 1992). Se ha visto cómo las GAs también son necesarias para el desarrollo normal de las flores, ya que, mutantes de tomate deficientes en GAs son androestériles y no completan el desarrollo de sus estambres y pétalos hasta que no se añaden GAs exógenamente ( Jacobsen y Olszewki, 1991). Así mismo el ácido giberélico también es importante a la hora de desarrollar frutos, esto se ha comprobado mediante la aplicación exógena de GAs y viendo cómo esta promueve la fructificación (Pharis y King, 1985), además de que si añadimos GAs a ovarios no polinizados se induce el desarrollo partenocárpico del fruto ( Alabadí *et al.*, 1996).

### **1.3 Auxinas**

Las auxinas son otras de las fitohormonas fundamentales en el desarrollo de la planta, puesto que al igual que las giberelinas intervienen en un gran número de procesos del desarrollo vegetal, como el crecimiento celular y del tallo, la división celular, el inicio del crecimiento de las raíces, el crecimiento y desarrollo de los frutos, la floración o provocar la dominancia apical entre otros (Davies, 2010).

### 1.3.1 Tipos y biosíntesis de auxinas

Como podemos ver en la figura 3, existen distintas formas de esta hormona, siendo el ácido indolacético (IAA) la predominante. Asimismo, tenemos otras formas como el 4-cloroindolacético (4-Cl-IAA), el ácido fenilacético (PAA), ácido indol-butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (IPA, Ludwig-Müller & Cohen 2002). Además de estas, que se corresponden con las auxinas naturales, encontramos las denominadas auxinas sintéticas, con grandes aplicaciones en la agricultura, como el ácido naftalenacético (NAA), el ácido 2-metoxi, 3,6-dicloro benzoico (dicamba), el ácido 2,4 diclorofenoxibutírico (2,4-DB) o el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T)



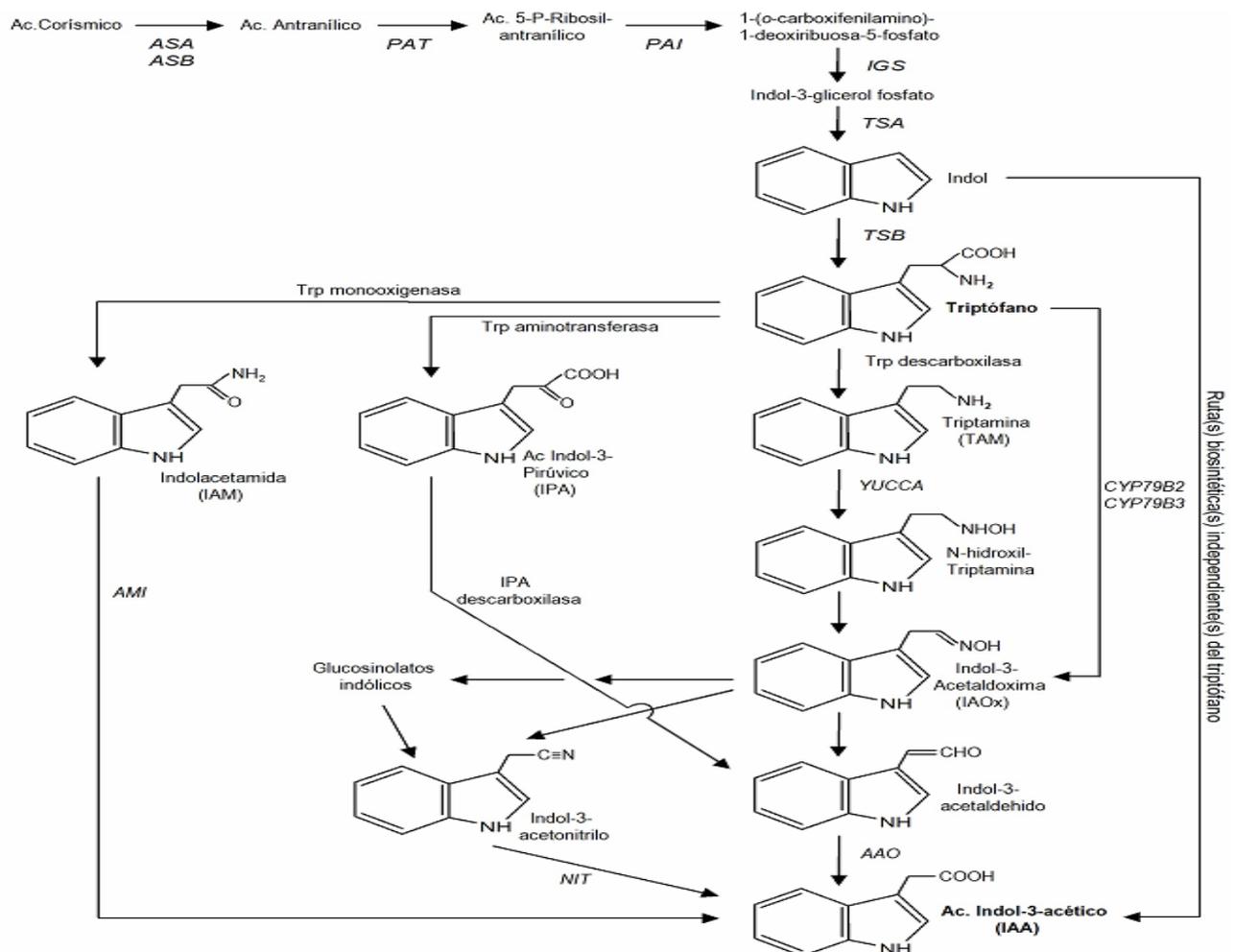
**Figura 3:** Estructura química de auxinas naturales (IAA, 4-Cl-IAA, PAA, IBA) y sintéticas (NAA, dicamba, 2,4-DB, 2,4,5-T)

Se han observado niveles de auxinas endógenas en todos los tejidos vegetales, siendo su síntesis mucho mayor en aquellos tejidos que están en crecimiento, como los meristemas apicales, hojas jóvenes o frutos. Las rutas mediante las cuales las auxinas se sintetizan (figura 4) no están perfectamente caracterizadas, de tal forma que las enzimas e intermediarios que intervienen no se han definido tan bien como en el caso de las giberelinas, y, particularmente, en el caso del tomate, tenemos menos información, puesto que hasta ahora ha sido mejor caracterizada en *Arabidopsis*. Sin embargo, si se distinguen dos rutas biosintéticas para producir IAA (la auxina más común), una dependiente del aminoácido triptófano (Trp) y otra independiente de él, siendo la primera la más importante y de la que más información tenemos.

Dentro de la ruta del triptófano encontramos cuatro vías diferentes. La primera de esas vías se basa en la descarboxilación del Trp para producir triptamina (TAM). La segunda ruta se da por oxigenación para formar indolacetamida (IAM), la cual pasará a IAA tras la acción de una IAM hidrolasa, esta ruta se ha visto en bacterias como *Pseudomonas syringae*, pero se ha visto cómo también ocurre en *Arabidopsis* (Pollmann *et al.*, 2003). La tercera ruta dependiente del triptófano ocurre mediante la transaminación de éste para dar lugar a ácido indol-3-pirúvico (IPA), esta ruta también es propia de algunos microorganismos, pero, pese a que aun no se han caracterizado las enzimas que regulan la conversión de Trp a IPA y de IPA a IAA, sí se

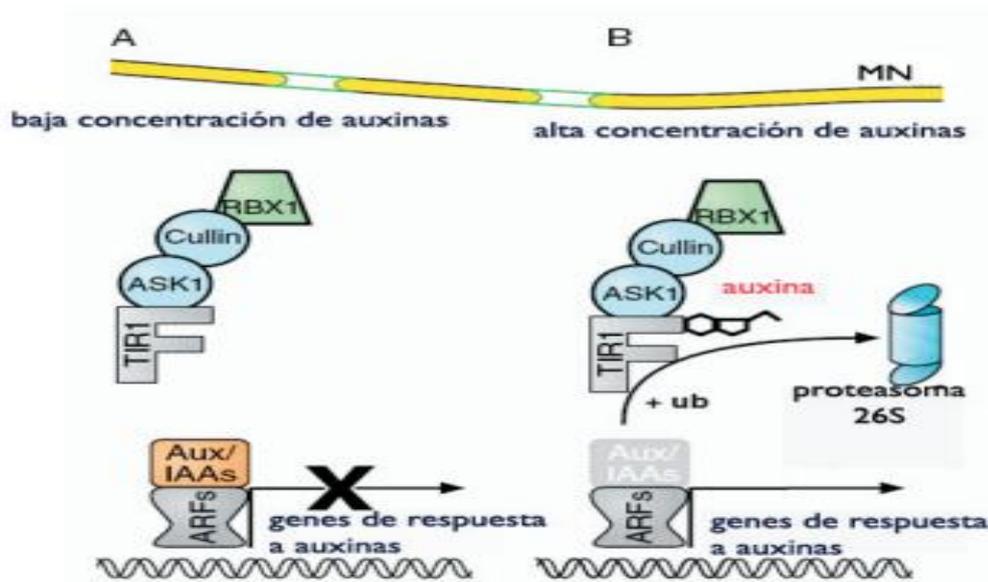
han visto niveles de IPA en plantas. Por último, la cuarta ruta se basa en la acción de dos enzimas citocromo P450 (CYP79B2 y CYP79B3 en *Arabidopsis*) que regulan la conversión de Trp a indol-3-acetaldoxima (IAOx) mediante oxigenación, este pasará a indol-3-acetonitrilo, que será convertido a IAA por enzimas nitrilasas. Además, en esta ruta se ha podido ver como IAOx es un punto común en ruta de síntesis de IAA y de otros compuestos secundarios llamados glucosinatos indólicos los cuales pueden ser una fuente de auxinas conjugadas (Bak *et al.*, 2001). Esta forma conjugada es como se encuentran la mayoría de las auxinas pese a que sólo cuando están libres son biológicamente activas, pero se conjugan con el fin de mantener la homeostasis, bien para liberar IAA por hidrólisis o para inactivarlas (Staswick *et al.*, 2005). Asimismo, la destrucción de las auxinas se puede dar de dos formas: por oxidación descarboxilativa de la cadena lateral y por oxidación en las posiciones 2 y 3 del anillo indólico, sin descarboxilación (Woodward & Bartel, 2005).

Por otro lado, también se ha visto la presencia de IAA en plantas incapaces de sintetizar triptófano, lo que indica que deben existir rutas alternativas independientes de este aminoácido para producir auxinas, pero estas no ha sido estudiadas apenas y sólo se tiene conocimiento de algunos genes que pueden intervenir en ellas (Ouyang *et al.*, 2000).



**Figura 4:** Rutas de biosíntesis del IAA. Las enzimas aparecen con el nombre de la enzima que catalizaría la reacción o con el nombre del gen representativo identificado en *Arabidopsis*

El mecanismo mediante el cual las auxinas ejercen sus funciones está mejor caracterizado que su síntesis (figura 5). En el núcleo celular cuando las auxinas se unen a su receptor (TIR1) activan el complejo SCFTIR1 (Skp1 – Cullin – F-box) el cual se encargará de eliminar al represor Aux/IAA, una proteína nuclear de vida corta que impiden a las auxinas ejercer sus funciones. El mecanismo mediante el cual son eliminadas es la ubiquitinación de las mismas, lo que conducirá a su degradación por el proteosoma 26S y permitirá que los factores de transcripción de respuesta a auxinas (ARF) puedan transcribir los genes diana de esta hormona (Jenik & Barton, 2005).



**Figura 5:** Mecanismo de acción de las auxinas, distinguiendo entre dos situaciones. (A) Cuando la concentración de auxinas es baja la transcripción de los genes está bloqueada. (B) Cuando se alcanza el nivel adecuado de la hormona el represor se degrada para permitir la transcripción de los genes diana de auxinas.

### 1.3.2 Efectos fisiológicos de las auxinas

Las auxinas, como hemos dicho antes, intervienen en un gran número de procesos del desarrollo de la planta puesto que, junto con otras fitohormonas, influyen en la diferenciación y división celular así como el crecimiento. Por un lado se ha visto que tienen un papel importante en el desarrollo y regulación del crecimiento de las raíces. Así, mientras que las auxinas promueven el crecimiento del tallo, en las raíces provocan la inhibición del crecimiento en la raíz primaria facilitando el desarrollo de las raíces secundarias. El proceso de rizogénesis está íntimamente ligado a la división celular. Así, las auxinas estimulan la división de células localizadas en el periciclo en la zona, justo arriba de la zona de elongación para provocar la formación de raíces laterales (Jenik & Barton, 2005). Además, las auxinas intervienen en la síntesis del etileno, que es un inhibidor del crecimiento radicular, controlando de esa forma el desarrollo adecuado de las mismas. Se ha visto que esta hormona también tiene un papel importante a la hora de regular los tropismos (movimientos durante el crecimiento provocados por un estímulo direccional como puede ser la gravedad, la presencia de luz o el contacto). Las auxinas controlan el crecimiento del tallo y regulan la dirección de éste por efecto de los tropismos. Pese a que ha sido criticado, este efecto se puede explicar con el

modelo de Cholodny-Went, que estipula que el crecimiento diferencial del tallo es debido a una distribución diferencial de la hormona en el tallo, por ejemplo en el caso del fototropismo (tropismo provocado por la luz) la auxina que se produce en el ápice, en vez de ser transportada a la base es dirigida hacia el lado sombreado. Sin embargo, esta teoría es criticada por quienes dicen que las auxinas no son la única razón por la que se da este efecto, sino que es provocado por más factores (Esmon *et al.*, 2005).

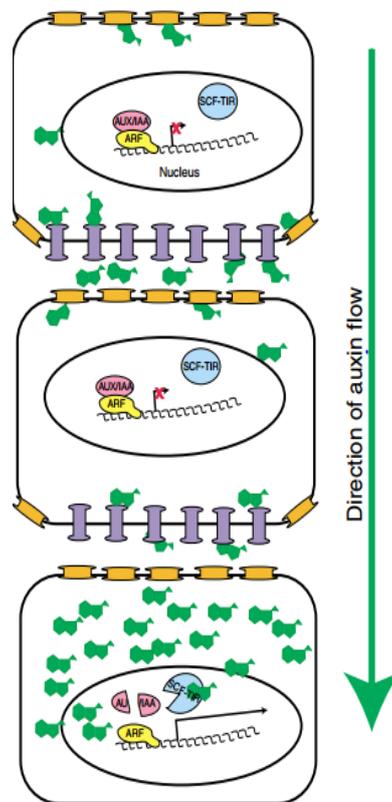
Otros de los principales efectos asociados a estas hormonas es la dominancia apical, es decir, el predominio del crecimiento de la yema apical de la planta por encima de las yemas axilares inferiores hasta que cesa su crecimiento, permitiendo que otras de esas yemas axilares tomen su lugar. Esto se empezó a sugerir a través de experimentos como el de Thimann y Skoog (1933), en el que vieron que, tras quitar el ápice de la *Vicia faba*, el reservorio principal de IAA en el tallo, se estimulaba el crecimiento de las ramas laterales. Si a estas plantas decapitadas, a la que le habían quitado el ápice, se le aplicaban auxinas vieron como inhibían el crecimiento de las yemas axilares, postulándose así como la hormona que causaba la dominancia apical. Posteriormente se ha visto, al cuantificar y observar los gradientes en el tallo y ver la mayor presencia de IAA en las zonas de crecimiento activo, el ápice primario, frente a la base del tallo. Sin embargo, el modo de acción de las auxinas en este proceso no está claro aún, se han postulado algunas teorías, como que promueve la acumulación de citocininas provenientes de la raíz y estas son las causante de la dominancia apical, aunque esto no se ha confirmado.

Por último, se ha visto que las auxinas también tienen un papel importante en la abscisión de órganos, inhibiendo la caída de hojas y frutos. El movimiento de la hormona a la base del peciolo parece evitar la abscisión, inhibiendo la acción de la hormona etileno, que es la que lo provoca. Además, conforme los tejidos foliares son más viejos, su nivel de auxinas también decrece, permitiendo que el etileno actúe y la abscisión prosiga. Sin embargo, se han visto casos donde al aplicar auxinas en el lado opuesto de la abscisión se promueve la acción del etileno para que se dé la abscisión (van Doorn & Otead 1997). Asimismo, se ha visto que ejercen un efecto importante en el desarrollo de flores y frutos. Esto se ha demostrado en experimentos en los que se han usado inhibidores de auxinas que han provocado un retraso en la formación de frutos y flores. Además se ha comprobado como la aplicación exógena de IAA induce el desarrollo floral en varias especies (Pfluger & Zambryski 2004).

#### **1.4 Transporte de auxinas**

Las auxinas son capaces de adaptar el crecimiento de las plantas a los cambios ambientales que las rodean, como los tropismos vistos anteriormente, gracias a que son capaces de regular su distribución en función de las necesidades de la planta. Esto lo consiguen gracias a su sistema polar de transporte a lo largo del tallo. Este transporte se da desde la zona donde es sintetizado hacia donde ejercerá su acción, en el tallo se mueve desde el ápice a la base de la planta (basípodo) y al revés en las raíces, de la base al ápice (acrópodo). El transporte de las auxinas a lo largo del tallo es un proceso complejo (figura 6), por el cual la hormona es transportada de célula a célula de manera unidireccional y con la participación de varias proteínas. En primer lugar hay que tener en cuenta que las auxinas son ácidos débiles, por lo que el gradiente de pH entre la pared celular (pH de 5) y el citoplasma (pH de 7) facilita

la entrada de IAA, en su forma reducida, a través de la membrana citoplásmica. Ya en el citoplasma, el alto valor de su pH provocará la ionización de IAA, impidiendo que salga en su forma oxidada (Lomax et al. 1995). Aun así, como hemos, dicho el transporte de auxinas por las células necesita de proteínas transportadoras. Una de ellas es la AUX1, proteína transmembrana que se encuentra localizada en la membrana de forma asimétrica, en algunas células se encuentra en la superficie contraria al flujo de salida de auxinas, mientras que en otras ocasiones se encuentra en la superficie de la membrana por donde la auxina sale de la célula (Jenik & Barton, 2005; Swarup *et al.*, 2004). Otras de las proteínas cruciales para el transporte de auxinas por el tallo es la proteína PIN, cuya función se centra en dirigir la salida de Auxinas de las células, mientras que las AUX1 están más vinculadas a la recepción de la hormona. Las proteínas PIN tienen motivos de transmembrana y al igual que las AUX1, las proteínas PIN están asimétricamente distribuidas en la membrana plasmática. Así, el movimiento de las auxinas hacia la base del tallo se debe a la disposición basal de las proteínas PIN y la localización superior de las AUX1. En base a esto, dependiendo de las necesidades de esta hormona en los distintos tejidos, las proteínas PIN se recolocarán de forma que las auxinas se dirijan al lugar adecuado. Las proteínas PIN además se están reciclando constantemente en la superficie de la membrana a través de la proteína de membrana GNOM. Este sistema de reciclaje permite el cambio rápido de la distribución de PIN ante los cambios ambientales, como la luz o la gravedad. También se ha visto que las propias auxinas juegan un papel importante en su transporte, ya que interviene en la transcripción, acumulación y localización de las proteínas PIN, ayudando a estabilizarla (Rameau et al., 2015).



**Figura 6:** Transporte de polar de auxinas, mediado por las proteínas Aux1 (las naranjas) y las PIN (las moradas). La transcripción de los genes de respuesta a auxinas sólo se da cuando la concentración de la hormona es la adecuada.

### 1.5 Interacción entre giberelinas y auxinas

Una vez visto cómo se sintetizan ambas hormonas y en qué aspectos del desarrollo intervienen, pese a la falta de información que queda por descubrir, es lógico suponer que ambas hormonas están relacionadas, tanto a la hora de su síntesis como en los efectos que producen sobre las plantas. En el caso de estas dos hormonas se ha visto cómo ambas colaboran en los procesos que regulan la expansión y diferenciación celular, promoviendo el desarrollo de flores y frutos, así como el crecimiento del tallo.

Cuando observamos la ruta de señalización y de biosíntesis de las GAs vemos cómo las auxinas tienen un gran efecto en los mismos. En estudios en *Arabidopsis* se ha visto que para el crecimiento de las raíces es necesario una fuente de auxinas. Esto se comprobó al quitar el ápice, la principal fuente de auxinas, y ver cómo las funciones de elongación en las raíces provocadas por las GAs eran inhibidas, y la vuelta a la normalidad tras la aplicación exógena de IAA. Además, en otros experimentos, al aplicar inhibidores del transporte de auxinas, el efecto de las GAs en la elongación de las raíces, así como en la degradación de RGA (regulador negativo en la ruta de señalización de las GAs) en las células de las raíces también fue suprimido (Silverstone et al., 1998). Estas observaciones sugieren que la auxina tiene un papel activo en la degradación del represor de la síntesis de GAs, DELLA. Aparte de esto, las auxinas también intervienen en la biosíntesis de GAs en el tallo, regulando la expresión de los genes implicados en la síntesis de GAs en estos tejidos. Esto se vio repitiendo los experimentos de decapitación del ápice en plantas de tabaco y guisante. Así, la auxina favorece la expresión de los genes que codifican las enzimas GA20ox y GA3ox, además de reducir la expresión de la GA2ox, enzima encargada de desactivar las GAs. Por lo tanto, las auxinas intervienen en la síntesis de GAs tanto promoviendo la degradación de DELLA, como interviniendo en las rutas de síntesis favoreciendo la expresión de los genes que codifican las enzimas de síntesis (Weiss & Ori, 2007).

Por otro lado, también se ha visto como las giberelinas favorecen el transporte de auxinas puesto que ayudan en la estabilización de las proteínas PIN que se encuentran en la membrana y regulan el paso de auxinas de una célula a otra. Esto es contrario al efecto provocado por otras enzimas como las estrigolactonas, que desestabilizan estas proteínas interponiéndose así en el transporte polar de las auxinas por el tallo (Rameau et al., 2015)

## **2. OBJETIVOS**

Como se puede ver en la introducción, la síntesis y función de las giberelinas y auxinas ha sido caracterizada. Sin embargo, la información que poseemos viene principalmente de especies como *Arabidopsis* y arroz, por lo que en otras especies, como el tomate, aun queda trabajo por hacer. A día de hoy gracias a variedades de tomate como Micro-Tom podemos estudiar mejor el genoma del tomate para ver los genes implicados en la síntesis y en las respuestas desencadenadas por la acción de estas dos hormonas. Así, en esta investigación trabajamos con dicha variedad para intentar comprender mejor la influencia que estas dos hormonas pueden ejercer entre sí.

Por lo tanto, en este trabajo, para comprender mejor las interacciones entre giberelinas y auxinas se pretende estudiar cómo la alteración de genes clave en la síntesis de giberelinas puede estar implicada en distintos procesos del desarrollo, así como en la producción de auxinas en Micro-Tom. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos principales:

1) En primer lugar, estudiar como la variación en la síntesis de giberelinas, bien sobreexpresando las mismas, silenciando las enzimas implicadas en su desactivación o cambiando la cantidad de la principal Giberelina activa ( de GA1 a GA4), afecta en el proceso de germinación de las semillas de Micro-Tom.

2) Comprobar, mediante cuantificación de giberelinas por HPLC-MS/MS, si las líneas transgénicas de Micro-Tom que varían la síntesis de dicha hormona cumplen los cambios previstos. Para ello veremos los distintos niveles de las distintas giberelinas activas y sus precursores a lo largo del tallo.

3) Ver qué diferencias provocan dichos cambios en la síntesis de giberelinas en la producción de auxinas por parte de la planta Micro-Tom. Para ello utilizaremos técnicas de HPLC-MS/MS para cuantificar la cantidad de auxinas a lo largo del tallo.

4) Localizar y ver el transporte de auxinas a lo largo del tallo de Micro-Tom a través de una tinción GUS ( $\beta$ -glucuronidasa) que nos ayude a localizar esta hormona. Para ello usaremos la línea transgénica DR5, la cual tiene la construcción DR5-GUS, siendo DR5 el promotor de gen de respuesta de auxinas.

El fin de estos objetivos, como se ha dicho antes, es comprender mejor como actúan estas dos hormonas en el tomate, tanto a la hora de transportarse, como en el caso de las auxinas con la tinción GUS, como en procesos del desarrollo como la germinación, o en la propia síntesis de estas hormonas.

# **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Material vegetal

En el presente trabajo se utilizaron diferentes líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Micro-Tom. En total se cultivaron cinco líneas diferentes que han sido sintetizadas en el IBMCP, en el laboratorio de Isabel López, a partir de la línea Mt y cuyas características vienen explicadas en la tabla 1.

**Tabla 1:** Descripción del fenotipo y genotipo de las líneas de Micro-Tom utilizadas

LÍNEAS	GENOTIPO	FENOTIPO
Mt (control)	Línea mutada, en la que el gen Dwarf ha sido modificado (mutación alelo d) dando lugar a un déficit en la síntesis de brasinoesteroides	El fenotipo de esta línea control se caracteriza por ser más bajo y con un patrón de ramificación menor.
Pro	Mutante SIDELLA. Pérdida de la función de la proteína DELLA (represor de la síntesis de GAs), lo que dará lugar a la activación constitutiva de vía de respuesta a GAs.	Como consecuencia de que la respuesta de giberelinas está inducida constitutivamente las plantas serán más altas y con un patrón de ramificación menor.
L1	Línea transgénica 35S::shRNA2ox. Genotipo caracterizado por el silenciamiento de los genes de enzimas catabólicos GA2ox (enzimas encargadas de inactivar las GAs).	Como consecuencia del silenciamiento las plantas de tomate serán más altas y con un patrón de ramificación menor.
20ox	Línea transgénica 35S::CcGA20ox1. Sobre-expresión del gen de enzima de biosíntesis GA20ox1.	Al sobreexpresar la enzima encargada de sintetizar las GAs las plantas también serán más altas y con un patrón de ramificación menor.
DR5	Línea transgénica igual que la línea Mt pero modificada para obtener un gen delator, GUS, que codifica la $\beta$ -glucuronidasa, controlado por el promotor DR5 que nos mostrará la localización del IAA.	El fenotipo es igual que el de MT con la singularidad de que tras aplicar el método de tinción GUS el IAA de la planta quedará marcado.

#### 3.1.2 Material para el cultivo de plantas

Para la germinación de las semillas se utilizó un **medio de germinación** formado por agar (0,7%) y H<sub>2</sub>O (0,7 g agar/ 100 ml H<sub>2</sub>O).

En la siembra en invernadero se utilizó una solución nutritiva, denominada Hoagland, cuya composición viene indicada en la tabla 2:

**Tabla 2:** Composición de la solución nutritiva Hoagland

PRODUCTO	COMPOSICIÓN
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,15 (g/L)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,82 (g/L)
KNO <sub>3</sub>	0,2 (g/L)
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,35 (g/L)
MgSO <sub>4</sub>	0,24 (g/L)
<b>BMX (Micronutrientes)</b>	0,1 (g/L)

### 3.1.3 Material de extracción y cuantificación de hormonas

#### 3.1.3.1 Columnas empleadas en la extracción hormonal

En la extracción hormonal se utilizaron las columnas de cromatografía OASIS HLB (Waters, 30 mg, 1 mL, 30 µm de tamaño particular, Ref 186003908). Se caracterizan por incorporar un copolímero humedecible en agua, equilibrado hidrofílica y lipofílicamente, absorbente de fase reversa y que es óptimo para la extracción de un amplio rango de compuestos ácidos, básicos y neutros. Dichas columnas se colocaban en un sistema de filtración SPE. Para evaporar los residuos de MeOH que se tienen que añadir durante la extracción recurrimos al Rotavapor (figura 7).



**Figura 7:** sistema de filtración SPE (izquierda) y Rotavapor (derecha)

#### 3.1.3.2 HPLC- MS/MS

Para la cuantificación y el análisis hormonal se utilizó el Espectrómetro Q-Exactive acoplado a UPLC y autosampler, con generador de N<sub>2</sub>, instalado en el laboratorio de Cromatografía del IBMCP (figura 8). El Q-Exactive es un espectrómetro de masas con un analizador Orbitrap de alta resolución y exactitud de masa. La generación de iones se produce en la fase líquida procedente del UPLC mediante ionización por electrospray (ESI) a presión atmosférica (API).

Además de esto se necesitan estándares internos que se usaron como referencia a la hora de cuantificar la cantidad de cada una de las hormonas y que se adicionaran a las muestras durante el proceso de extracción hormonal. Esos estándares se forman con una mezcla deuterada de las distintas hormonas (en nuestro caso solo usamos GAs e IAA), las cuales fueron encargadas a la casa comercial Oilchemim Ltd en Checoslovaquia.



**Figura 8:** Espectrómetro Q-Exactive

### 3.1.4 Soluciones para la tinción GUS

Para la tinción GUS que marcará las zonas donde se encuentra el IAA se utiliza una solución de tinción compuesta a su vez por dos soluciones, una para el lavado (solución de lavado) y otra para la tinción en sí, las cuales sólo se diferencian por la presencia del sustrato X-Glc en la segunda solución, ya que éste es el que permite marcar las zonas donde se encuentra la hormona. El resto de componentes que se describen a continuación se encuentra presente en ambas soluciones: Triton X-100 al 10%, tampón fosfato 1 M (PH 7,2) formado a partir de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$  1 M (35,8 g/100mL) y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  1M (15,6 g/ 100mL); ferrocianuro 100 mM (2,1 g/ 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ), ferricianuro 100 mM (1,65 g/ 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ). Estos dos últimos compuestos deben almacenarse a 4°C y en condiciones de oscuridad. En el caso de la solución de tinción se le añade X-Glc 100 mM en Dimetilformamida . Así, para preparar 100 ml de la solución de tinción (50 mL de la solución de lavado y 50 de la solución en sí) se tienen que añadir los siguiente volúmenes recogidos en la tabla 3:

**Tabla 3:** Volúmenes necesarios para 100 mL de solución de tinción

Componente de la solución	Volumen
<b>0,2 % Tritión X-100</b>	2 mL del stock de 10 %
<b>50 nM tampón fosfato sódico Ph 7,2</b>	5 mL del stock 1M
<b>5 mM ferrocianuro</b>	500 µL del stock 100 mM
<b>5 mM de ferricianuro</b>	500 µL del stock 100 mM
<b>2 mM X-Glc (sólo se echa en los 50 mL de la solución de tinción)</b>	1 mL del stock 100 mM

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Cultivo de plantas y división del tallo**

#### **3.2.1.1 Germinación y cultivo de las plantas en invernadero**

La germinación de las plantas se llevó a cabo en placas Petri donde se colocaron entre 12-18 semillas (dependiendo de la línea y de la disposición y número de semillas que había disponible en ese momento). Para lograr la germinación, antes de colocar las semillas, se coloca la solución de germinación mencionada anteriormente en el apartado de materiales. Para formar dicha solución pesamos el agar necesario y lo mezclamos con el agua, lo calentamos para que se disuelva bien y depositamos en torno a 25 ml de la solución por placa, dejando a continuación que se enfríe hasta que podamos depositar las semillas. Una vez colocadas las semillas se sellan las placas con parafilm para evitar la evaporación del agua. Cuando las placas están cerradas se procede a la incubación de las mismas, la cual tiene lugar en la cámara de cultivo en condiciones de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad), con una intensidad lumínica de 2000 luxes suministrada por una fuente de luz fría. La temperatura de la cámara fue de  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa fue del 70 % (durante el periodo oscuro) y 40 % (durante el periodo luminoso). Las semillas estarán germinando en estas condiciones entre 5/8 días (hay lotes que tardaron más tiempo en germinar), hasta que la mayoría de las semillas hayan formado los cotiledones y se encuentran en un estadio de plántula de 1/3 días. Hay que indicar que hubo plantas que no fueron germinadas del mismo modo, sino que sus semillas fueron depositadas directamente en los alveolos y tratadas con las condiciones de cultivo del invernadero, las cuales se explican más adelante. Las líneas que habían sido cultivadas en estas condiciones tenían unos entrenudos más alargados, bien por estas condiciones o porque precisamente dichas líneas son las que muestran una mayor respuesta a giberelinas (eran la 20ox y la L1). Pero la Mt también mostró dicho cambio y, a priori, si no fuera por este modo de cultivo no tendría por qué.

Una vez que las semillas han germinado y se han formado las plántulas estas se pasan al invernadero para permitir que la planta de tomate continúe su crecimiento hasta el final de su fase vegetativa (en torno a las tres semanas desde que las plantas se pusieron a germinar y dos semanas desde que se pasan al invernadero). En el invernadero se procede al trasplante de las plántulas en alveolos de 12 cm de diámetro y una mezcla 2:1:1 de turba negra: perlita: vermiculita. Las plantas eran regadas por goteo dos veces al día usando la solución nutritiva descrita en la tabla 2 del apartado de materiales. El cultivo se realizó en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). La luz se suplementó mediante lámparas de vapor de mercurio de 400w. La temperatura se mantuvo dentro de un rango de  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante el día y de  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante la noche. La humedad relativa osciló entre 45-65% (diurna) y 75-90% (nocturna).

Para el análisis cuantitativo hormonal de tallo se utilizaron tres lotes distintos de semillas en función de los resultados obtenidos tras la primera cuantificación. El primero de esos lotes estaba formado por todas las líneas recogidas en la tabla 1 del apartado de materiales, con la excepción de la línea DR5 que sólo se usa para la tinción GUS. Los dos siguientes lotes sólo recogían las líneas 20ox, L1 y Mt puesto que en los resultados obtenidos

en la primera cuantificación de estas líneas (20ox y L1) fueron las que obtuvieron peores resultados y no había más semillas de la línea Pro disponibles (en esta línea tampoco se obtuvieron buenos resultados) mientras que la línea Mt se utiliza como control. Las semillas del primer lote se pusieron a germinar el 24/03/2015 y fueron traspasadas en el invernadero el 30/03/2015, las del segundo y tercer lote se pusieron a germinar directamente en los alveolos del invernadero, única diferencia con respecto al método utilizado con las semillas del primero. Las del segundo lote se pusieron a germinar el día 27/03/2015 y las del último lote el 03/06/2015. Hay que indicar también que en el primer lote no se cuantificaron las GAs, puesto que el patrón interno formado por el deuterado de hormonas que usa el método como referencia para cuantificar no fue añadido. En los lotes del 27/03/2015 y del 03/06/2015 sí que se añadió.

Además de estos lotes, se usaron otros dos para el análisis de germinación de las distintas líneas. Uno de ellos empezó a germinar el día 06/03/2015 pero no se utilizó para cuantificar debido a que las plantas crecieron demasiado y desarrollaron flores, haciendo que el resultado obtenido con estas líneas no fuera comparable, puesto que habían pasado la fase vegetativa. El otro se puso a germinar el 27/02/2015 y tampoco se cultivó por el mismo motivo. Las líneas cultivadas en estos últimos casos fueron las mismas que las descritas en la tabla 1 del apartado de materiales con excepción de la DR5.

### **3.2.1.2 División del tallo para la cuantificación hormonal**

La cuantificación de las hormonas de las diferentes líneas de tomate se realiza a partir de diversos fragmentos del tallo del tomate que cubren las diferentes zonas del mismo. Para ello, cuando las plantas ya están al final de la fase vegetativa, antes de que empiecen la floración (en torno a las 3 semanas desde que se pusieron las semillas a germinar y unos 10/14 días desde que fueron plantadas en el invernadero), se cortan para obtener las distintas secciones. Antes de iniciar los cortes se les quitan las hojas del tallo, dejando en los entrenudos una parte de las ramas emergentes. Las 5 secciones en las que se dividió el tallo vienen recogidas en la figura 9. En primer lugar se obtuvieron dos del primer entrenudo, que era el más largo, y del que utilizamos una primera sección más próxima a la raíz (S1a) y otra sección más próxima al cotiledón (S1b). A continuación cortamos una procedente del entrenudo siguiente al cotiledón y que precede a las primeras hojas verdaderas (S2), otra que se corresponde con el entrenudo que continua a las primeras hojas verdaderas y por último otra sección del entrenudo que precede al ápice de la planta. En el primer lote que fue analizado, cuyas semillas se pusieron a germinar el 27/02/2015, sólo la sección S1b del primer entrenudo fue analizada, puesto que para algunas réplicas las muestras de la sección S1a se perdieron. Así mismo la S4 tampoco pudo ser analizada porque apenas había muestras. Con el siguiente lote, el que se puso a germinar el 27/03/2015, la sección S1a tampoco fue analizada, mientras que en el último lote, el del 06/03/2015, todas las secciones mostradas en la figura 9 fueron utilizadas para la cuantificación hormonal



**Figura 9:** Secciones en las que se dividió el tallo.

Del mismo modo para la cuantificación hormonal en el tallo se usaron tres réplicas biológicas, con la excepción de la línea Mt de el último lote de semillas, que usó una más, así como las líneas Pro, 20ox y L1 del primer lote que tenían dos réplicas solo. Cada una de esas réplicas de las divisiones del tallo se obtenía con las secciones de tres plantas (para alcanzar el peso óptimo en la cuantificación, que oscila entre los 100 y 200g ), menos la S4 de las líneas del último lote que se realizo con 5 secciones S4 de distintas plantas ya que este entrenudo solía pesar menos y se necesitaba más para obtener el peso adecuado. Esto hace que para el análisis de la cantidad de hormona que hay a lo largo del tallo se hayan usado un total de cuarenta y cinco plantas de cada una de las distintas líneas, puesto que hay cinco secciones por planta, se hicieron tres réplicas de cada una de esas secciones y a su vez estas estaban formada por muestras de tallo de tres plantas.

Una vez obtenidas las muestras estas se introducen en tubos eppendorf que se depositan en nitrógeno líquido hasta que se machacan con la ayuda de un mortero. Una vez machacadas, se pesan (deben pesar entre 100 y 200 mg) y se almacenan en el congelador de -84°C hasta que se proceda a la extracción hormonal.

### **3.2.2 Método de extracción de Auxinas y Giberelinas**

El método mediante el cual se pudieron cuantificar las dos hormonas se basa en un proceso de extracción seguido de otro de purificación. En primer lugar se procede a la extracción de las hormonas. Para ello tomamos los tubos de las muestras, con un peso de tejido de 100 a 200 mg, y se les añade 1 mL del líquido de extracción (formado por 80% MeOH, 1% de Ac.acético y H<sub>2</sub>O). A continuación lo juntamos con una mezcla de GAs e IAA deuteradas que se usarán como patrones internos a la hora de calcular la cantidad de hormonas de

nuestro tejido. Una vez hecho, esto nos ayudamos del vórtex para homogeneizar bien las muestras y las dejamos en agitación durante una hora (mínimo) en la cámara de 4°C. Pasado ese tiempo centrifugamos a 14.000 g durante cuatro minutos (todas las centrifugaciones se hicieron con las mismas condiciones) y depositamos el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo. Al pellet que ha quedado se le echa un nuevo mililitro del líquido de extracción y se vuelve a agitar durante al menos quince min en la cámara de 4 °C, volvemos a centrifugar en las mismas condiciones y el sobrenadante lo depositamos en el tubo donde habíamos dejado el anterior. Dicho tubo será almacenado durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente los tubos se centrifugan de nuevo y el sobrenadante se deposita en unos tubos de vidrio que irán directamente al Rotavapor, donde se eliminará el MeOH quedando un extracto acuoso (debe tener un volumen menor de 400 µL, así nos aseguramos que el MeOH ha sido eliminado). El tiempo aproximado que los tubos deben estar en el Rotavapor para eso es de 2 horas y media, por último se completan esos 400 µL (o menos) que forman nuestro extracto con (Ac.acético 1% - H<sub>2</sub>O) hasta alcanzar 1 mL, preparando las muestras así para pasarlas por las columnas OASIS HLB . Con este último paso termina la parte de la extracción del protocolo.

El proceso de purificación se inicia equilibrando las columnas OASIS HLB donde vamos a purificar las muestras. Para ello, hacemos pasar por ellas, en este orden, 1 ml de ACN (acetonitrilo), 1 ml de MeOH (100%) y 1 mL de (Ac.acético 1% - H<sub>2</sub>O). Una vez equilibradas hacemos pasar nuestro extracto acuoso por la columna y a los tubos donde estaba dicho extracto se les echa otro mL de (Ac.acético 1% - H<sub>2</sub>O) para recuperar restos que hayan podido quedar en el tubo y para eliminar sales y compuestos polares. Este mL se pasa otra vez por la columna. Una vez pasados los 2 mL se eluye con el líquido de elución, (MeOH 95%-Ac.acético 1% - H<sub>2</sub>O). Cuando hemos eluido el tubo donde se ha recogido es llevado de nuevo al Rotavapor, durante al menos 3 horas y media, hasta que el tubo quede completamente seco. Este residuo seco se disuelve en 5% ACN-1% Ac.Acético-H<sub>2</sub>O, en un volumen que oscila entre los 100 y los 150 µL, dependiendo de la cantidad de tejido de la muestra. En el primer lote que analizamos el volumen fue de 100 µL porque las cantidades eran mucho menores que en el segundo y tercer lote donde añadimos 150 µL ya que había más cantidad. Una vez disuelto usamos el vórtex para homogeneizar e introducimos las muestras en los tubos a la espera de ponerlos en el espectrómetro para proceder a su cuantificación. Una vez introducidos en el espectrómetro, la cuantificación se realiza a través de un método informático. Este utiliza la información de las curvas de calibrado, cada una calculada para las diferentes hormonas, que se han introducido en el método y utiliza como referencia la mezcla deuterada de hormonas que queremos cuantificar y que hemos tenido que añadir durante la extracción. Además de eso tenemos que introducir el peso exacto del tejido de cada una de las réplicas y dependiendo de la hormona que queramos cuantificar un factor de dilución que dependerá de la cantidad de hormona en el tejido, para IAA era 200 mientras que para las GAs era 100, ya que de esta última hay una menor cantidad. Con el peso de tejido y ese factor de dilución se calcula un factor de conversión que, junto con los datos de la curva y los de la mezcla deuterada de hormonas, nos da la información de la cantidad de nuestra hormona en el tejido. Por último el análisis estadístico se basaba en la media entre la cantidades de las réplicas de las distintas secciones, seguido de un cálculo de error que era igual al ANOVA de las cantidades de esas réplicas dividido entre la raíz cuadrada del número de réplicas que hay para la sección en cuestión.

### 3.2.3 Método de tinción GUS

Mediante la tinción GUS podemos localizar el IAA a lo largo del tallo de las plantas, lo cual nos es de gran utilidad para poder ver el modo en el que estas se mueven a lo largo del tallo o dónde se almacena. Este método de tinción se basa en la línea transgénica DR5:GUS. DR5 es el promotor de respuesta a IAA mientras que GUS hace referencia a la  $\beta$ -glucosidasa, isoenzima que se encargará de transformar en sustrato X-Glc para poder ver las zonas donde se encuentre dicha hormona.

Para realizar esta tinción, en primer lugar recogemos las plantas DR5 del invernadero, les quitamos las hojas, dejando solo un poco del comienzo de las ramas en los nudos, después se coloca en acetona fría al 90% y se deja en hielo. A continuación, prefijamos el tejido colocando el material a temperatura ambiente durante veinte minutos, pasado este tiempo lavamos con agua destilada. Estos lavados se realizan en una cubeta donde depositamos los tallos de tal forma que queden totalmente cubiertos. Esto es de gran importancia sobre todo a la hora de añadir la solución de tinción. Después lavamos con la solución de tinción que no tiene el X-Glc, el sustrato necesario para que el IAA se vea, después sustituimos éste por la solución de tinción que tiene el sustrato X-Glc, y se infiltra en el vacío durante 10 minutos (como mínimo) asegurándonos de que todo el tejido esté bien sumergido en la solución para que se incorpore adecuadamente en el tallo. Una vez pasado el tiempo se deja incubar toda la noche a 37 °C. A la mañana siguiente se procede con el lavado para acabar la tinción. El lavado consiste en distintas series de una duración de 20 minutos con etanol a distintas concentraciones, de manera que cada vez este más concentrado (20, 35,50 y 70 %). Finalmente se deja en etanol al 70 %, pudiéndose quedar de esta forma el tiempo que sea necesario. Adicionalmente podemos añadir tras los lavados un paso que consiste en añadir tres series más de lavado con etanol al 80, 90 y 100%, en dicho orden, dejando sumergidas las muestras en etanol al 100 % durante toda la noche, con el objetivo de aclarar el tallo y poder ver mejor las zonas teñidas por la presencia de auxinas. Pasada la noche se realiza otro lavado con etanol al 70 % pudiéndolo dejar así el tiempo que sea necesario. Cuando queremos hacerle la foto con la lupa, lo sumergimos en glicerol al 10 % para poder verlo mejor. A la hora de hacer las fotos se realizaron tres procedimientos distintos. Por un lado se hicieron cortes transversales a distintas alturas del tallo, entre los entrenudos y nudos de este. Por otro lado se realizó un corte transversal de todo el tallo. Como en este caso no se podía hacer una foto de todo el tallo se hicieron varias fotos que solapaban entre si y que fueron unidas con el programa informático Fiji. Por último se hicieron fotos del tallo completo que se unieron con el mismo método que se usó anteriormente de juntar las fotos con el programa, ya que con la lupa no se podía cubrir el tallo completo. Por último las fotos fueron retocadas con el programa Adobe Photoshop CS3.

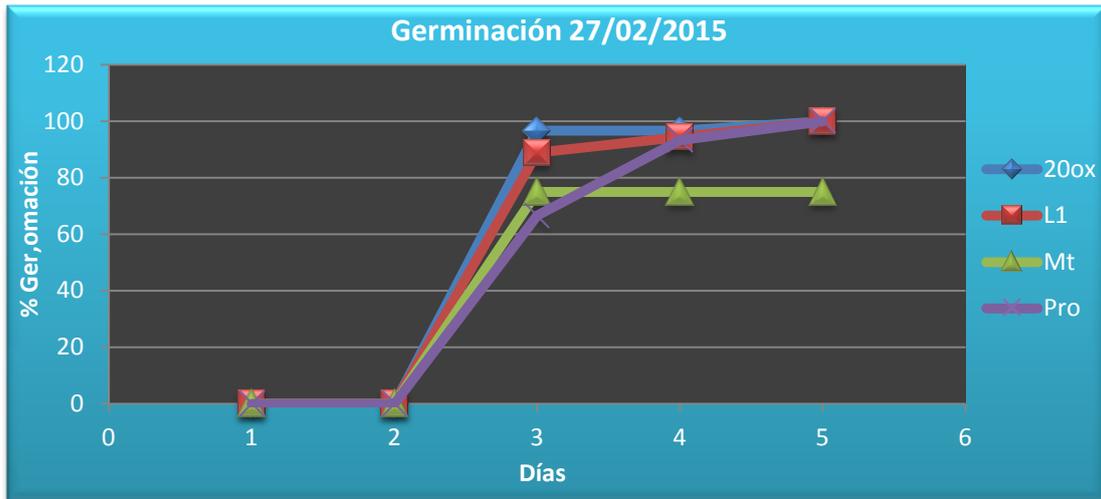
# **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1 Estudio de Germinación y aparición de los cotiledones

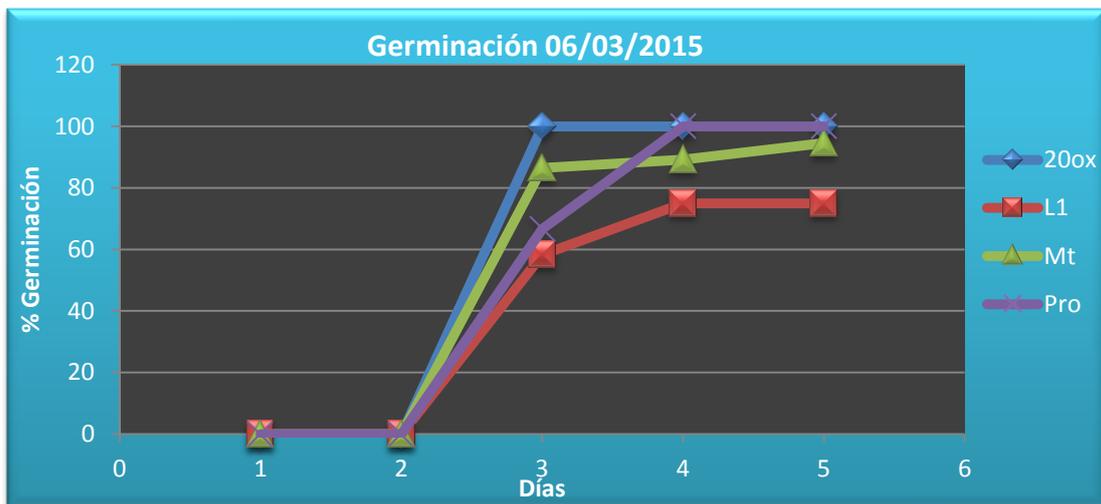
Para ver cómo las giberelinas actúan en el proceso de germinación en la planta Micro-Tom, se pusieron varios grupo de semillas a germinar, formados por las líneas descritas anteriormente en el apartado de materiales. Se usaron dos lotes con los cuales se estudió el proceso de germinación, el primero del 27/02/2015, y el segundo del 06/03/2015. Las placas donde se pusieron a geminar tenían entre 12 y 18 semillas y según el número de ellas que fuera germinando se calculaba un porcentaje a lo largo de los días que duraba el proceso de germinación. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la figuras 10 y 11, las cuales se corresponden con los lotes del 27/02/2015 y la del 06/03/2015 respectivamente.

Viendo ambos gráficos (figuras 10 y 11) podemos ver que al quinto día, con excepción de la línea Mt en el primer lote y la L1 en el segundo, todas la semillas han germinado. También se puede comprobar que no es hasta el segundo día cuando las semillas empiezan a germinar. Puesto que el recuento de semillas germinadas se hacía por la mañana, la germinación comenzaría entre la tarde y la noche del segundo día, ya que en el tercero muchas de esas semillas ya habían comenzado el proceso. Cuando se analiza la rapidez con la que las distintas líneas llegan a germinar todas sus semillas vemos que la línea 20ox es, en ambos casos, la primera en completarlo, seguida de la línea Pro. Ambas líneas están caracterizadas por la sobreexpresión de giberelinas, en el primer caso por la sobreexpresión del gen de enzima de biosíntesis GA20ox1, mientras que en la línea Pro se da por el silenciamiento de las proteínas represoras de la síntesis de giberelinas. Por otro lado la línea control Mt y la línea L1 han variado más entre los dos lotes de semillas, viéndose en esta última una mayor rapidez en alcanzar el 100 %, mientras que la línea Mt no lo alcanzó en ninguno de los dos lotes, quedándose muy cerca en el primero (95,5%). Sabiendo que la línea L1 se caracteriza por silenciar las enzimas que inactivan las dos giberelinas activas (GA1 y la GA4), y viendo que las líneas 20ox y Pro han germinado más rápido se comprueba que esta hormona cumple un papel de gran importancia en el proceso de germinación. Además, viendo que la línea 20ox es la que mejor patrón de germinación tiene ,se podría decir que de las dos GAs activas la GA4 podría acelerar el proceso puesto que, al contrario de lo que pasa en la planta control, en la L1 o en Pro, en la que la GA1 es predominante, en esta línea lo es la GA4, como se verá en la cuantificación de esta hormona más adelante (figura 18) . Con esto vemos que las giberelinas cumplen un papel importante en el proceso de germinación, como ya sabíamos por estudios como el de Koornneef *et al* (1990) o el Ogawa *et al* (2003), en el que tras inhibir la síntesis de giberelinas no se conseguía la germinación de las semillas hasta que se aplicaba la hormona de forma exógena. Lo curioso de este estudio es que la línea que más rápidamente ha logrado germinar las semillas (20ox) es aquella cuya GA activa predominante es la GA4, en vez de la GA1, como ocurre normalmente en tomate. Sin embargo dicha dominancia se ha visto a lo largo del tallo, especialmente al final del mismo en el final de la fase vegetativa. No sabemos si se daba tan claramente en el momento de la germinación, aunque es de suponer que sí, puesto que es de suponer que la sobreexpresión de la 20-oxidasa es el motivo de este cambio, ya que reduce la acción de la 13-oxidasa.

+



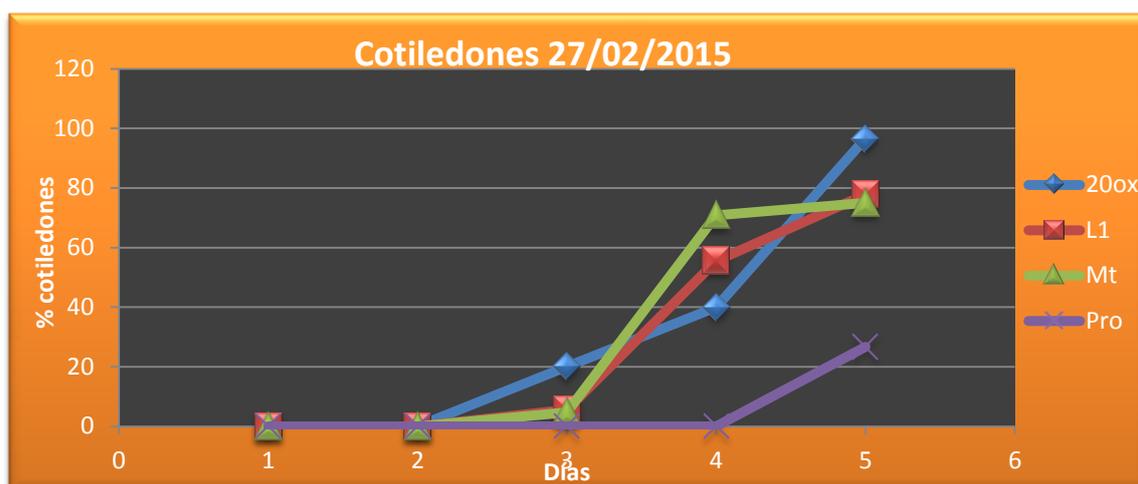
**Figura 10:** Porcentaje (%) de germinación a lo largo de los días del lote 27/02/2015, en el que se comparan las líneas 20ox, Mt, L1 y Pro.



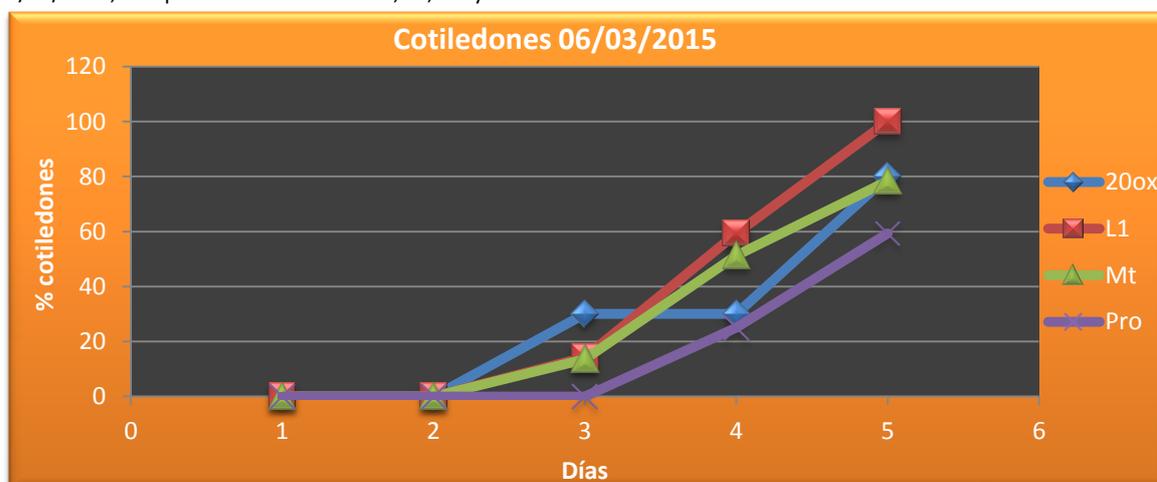
**Figura 11:** Porcentaje (%) de semillas germinadas a lo largo de los días del lote 06/03/2015 en el que se comparan las líneas 20ox, Mt, L1 y Pro.

Por otro lado, también se iba contando el número de cotiledones que iban apareciendo según las semillas iban germinando, calculando un porcentaje diario que se muestra en las figuras 12 y 13 correspondiente con los lotes del 27/02/2015 y del 06/03/2015 respectivamente. A la hora de analizar la aparición de los cotiledones los resultados obtenidos no son tan claros como los vistos en la germinación. Así, pese a que la línea 20ox es la primera que logro germinar el 100 % de sus semillas más rápidamente, no se observó que la aparición de cotiledones predominara en este línea tan claramente como en el estudio de germinación, al igual que con la línea Pro, cuyos resultados en la aparición de los cotiledones distan mucho de los obtenidos en la germinación. Aun así vemos que en ambos lotes se observan bastantes similitudes. Las líneas 20ox y L1 son las líneas que más cotiledones desarrollan, llegando la primera a desarrollar casi el 100 % en el primer lote y alcanzando la segunda esa cifra en el segundo lote. Sin embargo la línea Pro es la que menor número de cotiledones desarrolló en ambos casos pese a que fue de las líneas que más rápido germinó. La línea control Mt se comportó en este caso de forma parecida a la L1 y 20ox sin llegar nunca a ser la línea que más y más rápido los desarrolla. Como es lógico la aparición no se da hasta el tercer día, ya que

ninguna semilla había germinado antes, llegando a alargarse hasta el tercer y cuarto día en el caso de línea Pro, aun cuando en esta muchas de las semillas ya habían empezado a germinar. También se puede ver cómo incluso en el tercer día casi ningún cotiledón ha aparecido, siendo el cuarto y quinto en el que se observa un mayor crecimiento, con la excepción de la línea 20ox, que desde la tarde/noche del segundo mantiene un crecimiento más o menos constante (en el segundo lote se ve que hay un parón entre el día 3 y 4). En vista de estos resultados no podemos asegurar que las GAs tengan tanta importancia a la hora de desarrollar los cotiledones puesto que la línea Pro apenas ha desarrollado cotiledones y tiene la expresión de esta hormona activada de forma constitutiva. Aunque es verdad que tanto la L1 como la 20ox son las que mejores resultados han obtenido, lo que contradice lo visto en la línea Pro. Esto podría sugerir que las giberelinas tienen importancia en el desarrollo de los cotiledones pero no son tan importante en el mismo y se necesita de más señales, o bien que la línea Pro tuviera algún fallo (pese a que este no se detectó en el proceso germinación en sí). Además viendo la línea 20ox es posible que la GA4 también pueda influir con más peso a la hora de desarrollarlos, aunque la L1 ha mostrado resultados prácticamente iguales (lo cual no contradice lo anterior, puesto que esta línea solo silencia las enzimas que transforman las GAs activas en su forma inactiva).



**Figura 12:** Gráfica que refleja el porcentaje (%) de cotiledones que aparecen en los diferentes días del lote 27/02/2015, comparando las líneas 20ox, L1, Mt y Pro.

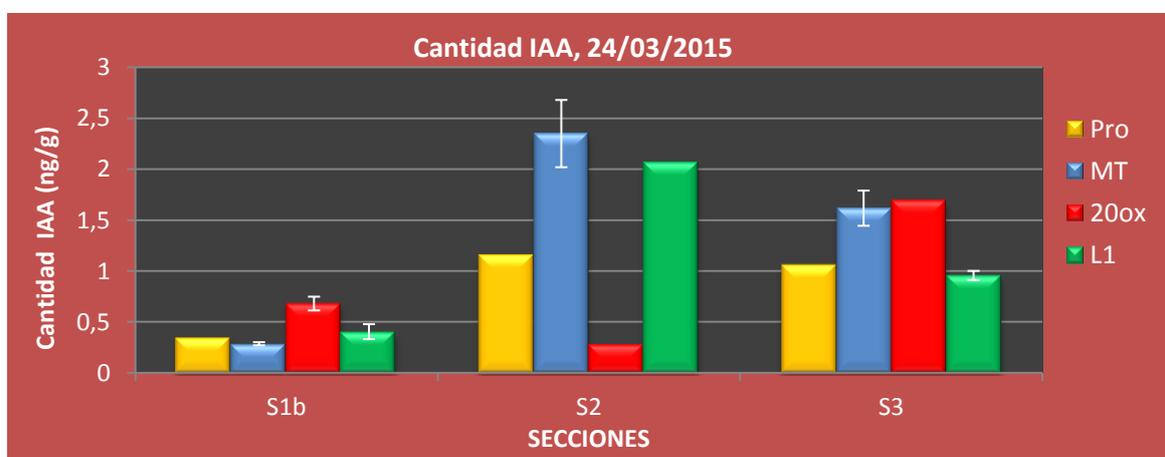


**Figura 13:** Gráfica que refleja el porcentaje (%) de cotiledones en los diferentes días del lote 06/03/2015, comparando las líneas 20ox, Mt, L1 y Pro.

## 4.2 Análisis de la cuantificación de IAA en Micro-Tom

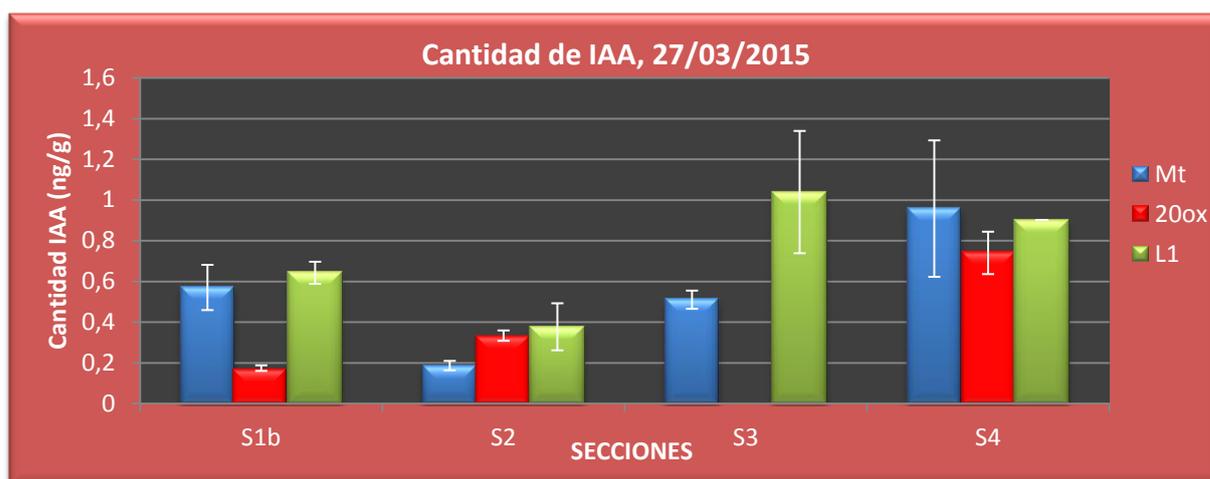
Para estudiar como las GAs influyen en la síntesis de IAA se usaron tres lotes de semillas distintos (24/03/2015, 27/03/2015 y el del 03/06/2015) todos cultivados en las mismas condiciones con excepción del primero que fue germinado in vitro en vez de directamente en el invernadero. Las líneas que se estudiaron en los distintos lotes han sido indicadas con anterioridad en el apartado de materiales y métodos. Los resultados obtenidos en la cuantificación de IAA vienen reflejados en las figuras 14, 15 y 16. En estas figuras vemos la cantidad de la hormona en las distintas secciones de la planta, las cuales varían en función del lote. La cantidad de hormona se cuantifica en nanogramos de la hormona en cuestión por gramos de tejido.

En la primera gráfica (figura 14) los resultados son los menos fiables de los tres lotes que fueron analizados ya que muchos de los resultados que se muestran se basan en la cuantificación de una única réplica. Particularmente el caso de la línea Pro ya que empezaron a surgir problemas a la hora de desarrollar los cotiledones y cuando fueron plantadas en el invernadero apenas crecieron, por lo que no había plantas suficientes para obtener el número necesario de réplicas que nos permitieran obtener unos resultados fiables. En este caso los resultados solo se basan en la cuantificación de una réplica y no se han podido calcular los errores. Con las líneas 20ox y L1 pasó algo similar pero en algunas secciones sí que se disponía de más réplicas, mientras que la línea Mt tenía al menos dos réplicas por sección. Pese a la baja calidad de estos primeros resultados, sí se puede apreciar que las secciones del tallo más cercanas a la raíz tienen una cantidad menor de IAA, lo cual concuerda con la hipótesis de que esta hormona es sintetizada en el ápice y transportada hacia la base del tallo, donde su concentración será menor (Jenik and Barton, 2005). Además la S1b es la única sección en la que casi todas las líneas tienen por lo menos dos réplicas para comparar, por lo que estos resultados serían los más fiables de este primer análisis. Analizando las distintas líneas de forma independiente se ve cómo es la línea control la que presenta mayor cantidad de IAA, resultado que se contradice con los análisis posteriores en donde las cantidades de IAA más altas se observan en las líneas que expresan mayor cantidad de GAs. Sin embargo la baja fiabilidad de esta primera cuantificación no permite sacar conclusiones sólidas frente a los otros análisis.



**Figura 14:** Datos de la cuantificación de IAA en el lote 24/03/2015, en el cual solo se cuantificaron las secciones S1b, S2 y S3 de las líneas Pro, 20ox, L1 y Mt. La cantidad de hormona viene indicada en nanogramos de hormona por cada gramo de tejido.

En la gráfica correspondiente al segundo lote que fue analizado (figura 15) los resultados se basan en los datos de tres réplicas, con la excepción de la S4 de la línea L1, en la que únicamente había una réplica y de la S3 en la línea 20ox, de la cual todas las réplicas se perdieron por una mala práctica en el laboratorio. Es por este motivo y por la aparición de errores bastante altos en las últimas secciones por lo que se procedió a hacer un tercer y último análisis (figura 16). En este segundo lote de plantas podemos ver cómo en las partes superiores del tallo la cantidad de hormona, por lo general, es más alta. Sin embargo, en estas secciones los errores son muy altos, existe mucha variación entre las cuantificaciones de las mismas, lo que hace que estos resultados no sean significativos. Por este motivo no se pueden sacar conclusiones concluyentes en este segundo análisis sobre qué línea contiene una mayor cantidad de la hormona ya que las secciones que más variación muestran para una determinada línea se basan en resultados con errores muy altos. Aun así se observa una mayor cantidad de IAA en las secciones correspondientes con la línea L1. Del mismo modo se observa que las secciones más bajas siguen siendo las que menos cantidad de la hormona muestran, pese a que en este caso la S1b no es la que ha mostrado menos cantidad de la hormona. En resumen, este segundo análisis tampoco nos proporciona resultados claros por lo que se procedió a realizar un tercer y último análisis.

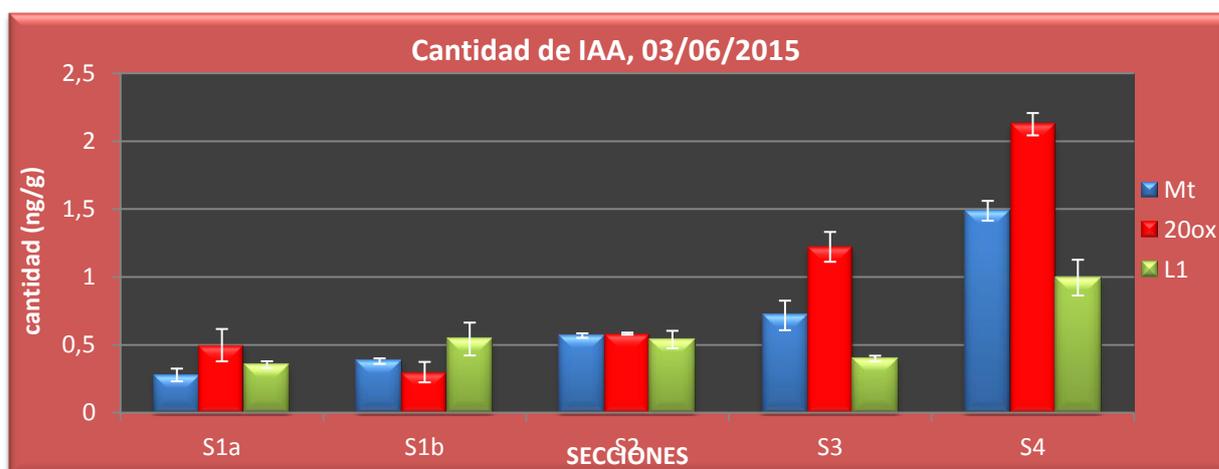


**Figura 15:** Datos de la cuantificación de IAA en el lote 27/03/2015, en el cual solo se cuantificaron las secciones S1b, S2, S3 y S4 de las líneas Mt, L1 y 20ox. La cantidad de hormona viene indicada en nanogramos de hormona por cada gramo de tejido.

El último análisis que se hizo fue el más completo y el que mejor resultado obtuvo, como se puede apreciar en la gráfica (figura 16). Se puede ver que se ha incluido una sección más con respecto a las dos cuantificaciones anteriores y además, todos los resultados se basan en la información obtenida de varias réplicas, por lo que todas tienen errores asociadas, que, además, no han sido muy altos por lo que si se han podido ver diferencias significativas. A primera vista se puede apreciar el aumento ascendente de la cantidad de IAA a lo largo del tallo, como en el caso anterior, observándose una mayor cantidad una vez que se han pasado los cotiledones (encima de la S2) y se ha llegado a las primeras hojas verdaderas, siendo mucho más alto en la última sección, más cercana al ápice. Esto se corresponde con lo visto en trabajos como el de Thimann and Skoog (1933) que postulan la participación de las auxinas en la dominancia apical, y establecen el ápice de las plantas como la fuente principal de esta hormona, la cual tiene un papel importante en el crecimiento del tallo.

Si nos centramos en las diferencias entre las líneas en este último análisis sí podemos sacar conclusiones más firmes, ya que, si bien es verdad que en las 3 primeras secciones la cantidad de IAA no varía mucho entre las líneas, esa diferencia sí se ve en las últimas secciones, en las que la línea 20ox muestra una cantidad bastante mayor con respecto a Mt y L1. Esto indica que la mayor presencia de GAs puede favorecer la síntesis de IAA, pese a que estos resultados no se han visto en la línea L1. Sin embargo esta última no tiene tanta cantidad de la hormona GA como la línea 20ox, en la que, como veremos más adelante hay mayor presencia de giberelinas (pasando a ser la GA4 la predominante). Aun así la línea L1 debería mostrar más cantidad de IAA que la línea Mt, puesto que no presenta giberelinas en su forma inactiva y la línea control sí.

Se ha visto que las auxinas tienen un papel importante en la biosíntesis de GAs en experimentos que han demostrado que, al inhibir la síntesis de IAA, la producción de GAs activas se ve afectada negativamente (Frigeiro *et al.*, 2006; Wolbang and Ross, 2001). Viendo nuestros resultados, y como la línea 20ox (que tiene más de GAs activas) presenta mayor cantidad de IAA, especialmente en la zona cercana al ápice, se puede deducir que las giberelinas también podrían jugar un papel importante en la síntesis de auxinas, si bien ya se ha visto que ayudan en su transporte por el tallo, mediante la estabilización de las proteínas PIN (Willige *et al.*, 2011). Sin embargo para saber hasta qué punto las GAs intervienen en la producción de auxinas, la biosíntesis de estas tendría que estar mejor caracterizada.



**Figura 16:** Datos de la cuantificación de IAA en el lote 03/06/2015, en el cual solo se cuantificaron las secciones S1a, S1b, S2, S3 y S4. La cantidad de hormona viene indicada en nanogramos de hormona por cada gramo de tejido.

### 4.3 Análisis de la cuantificación de giberelinas en Micro-Tom

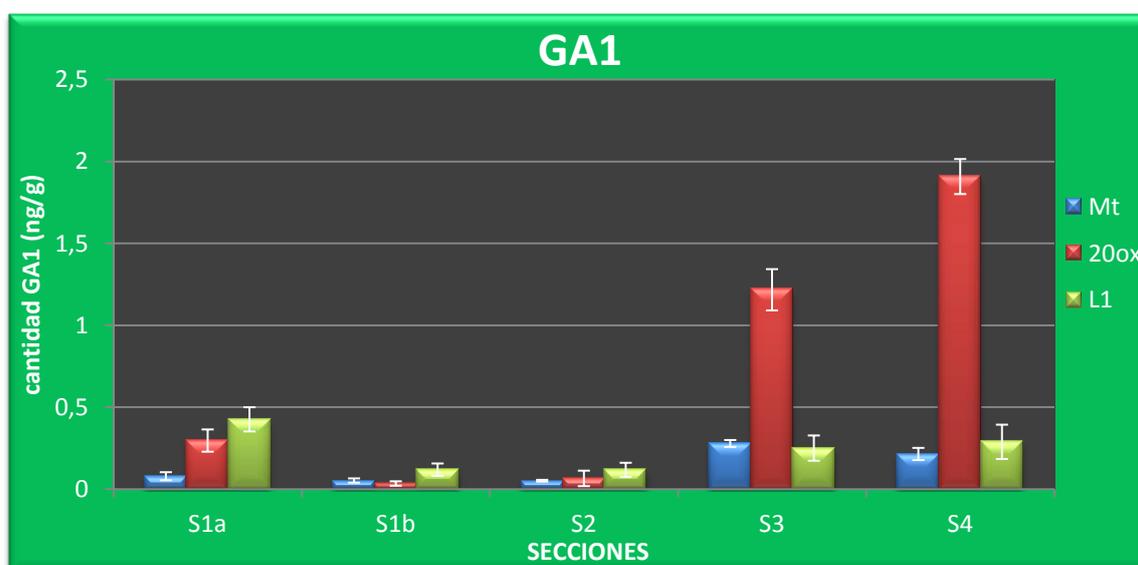
El análisis de las giberelinas no se ha hecho en tantos lotes como en el análisis de IAA, puesto que el estándar interno solo se añadió en el lote del 03/06/2015, cuantificando en este lote las dos giberelinas activas (GA1 y GA4) y sus precursores (GA9 y GA20). Habría sido interesante estudiar también sus formas inactivas (GA8, GA34, GA51 y GA29), pero por problemas técnicos no ha sido posible, dado que las curvas de calibrado de algunos de estas no estaban disponibles. Hay que destacar que esta hormona solo fue cuantificada en las líneas 20ox, L1 y Mt puesto que en el lote que se analizó no había disponible semillas de la línea Pro. En las figuras que nos muestran los niveles de esta hormona la cantidad se expresa de la misma forma que antes (ng de hormona / g del tejido). Los datos de análisis de estas

hormonas sirven para ver sus niveles a lo largo del tallo, así como para comprobar que las líneas han sido transformadas y cumplen con las características propias de su nuevo genotipo.

#### 4.3.1 Análisis de GA1

La GA1 es la Giberelina más activa en la especie de tomate Micro-Tom, lo que la hace ser el principal objetivo a la hora de analizar esta clase de hormona. Los datos de su cuantificación viene recogidos en la tabla 17, en este caso todas las secciones presentan tres réplicas para cada línea por lo que tienen unos errores asociados. Así, si observamos las líneas independientemente podemos ver cómo la línea 20ox tiene unos niveles significativamente más altos de esta hormona, principalmente en las secciones más altas del tallo. Se podría esperar que la línea L1 también mostrara mayores cantidades de la hormona pero el cambio que caracteriza esta línea es silenciar las enzimas que inactivan las GAs activas, por lo que se apreciaría al cuantificar las versiones desactivadas de GA1 y GA4 (GA8 y GA34 respectivamente). Aún así, por lo general, se aprecia una mayor cantidad de GA1 en esta línea que en la Mt, donde algunas de las GA1 están desactivadas, aunque la diferencia es mínima.

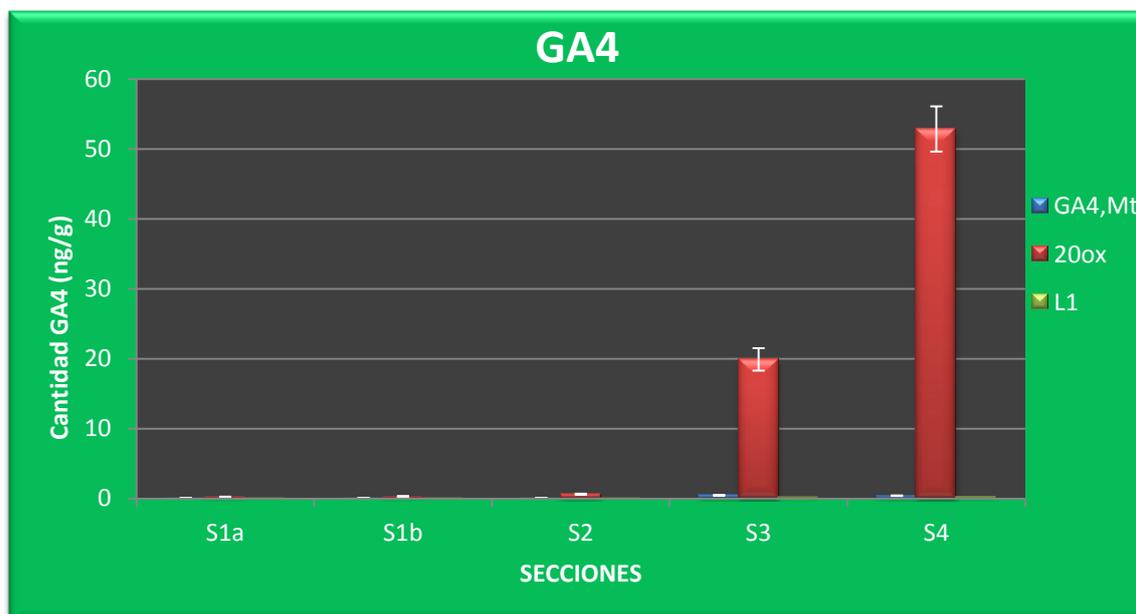
Además si observamos los valores de GA1 para todas la líneas, con la excepción de la sección S1a, en la que los valores están un poco por encima, también podemos apreciar unas valores mayores de la hormona en la parte final del tallo. Esto último apoya la teoría de que tanto IAA (tabla 16) como las GA1 juegan un papel importante en el crecimiento del tallo puesto que ambas se acumulan en la parte superior, justo al final de la fase vegetativa, cuando el tallo aun está creciendo. Además, como sabemos, ya que estamos tratando con tomate que tiene un sistema de ramificación simpodial, es el eje principal el que más crece relegando a un segundo plano el crecimiento de los brotes laterales. Sin embargo al comparar la cuantificación de IAA y GA1 en la línea control (MT) vemos como la GA no se acumula tanto al final del tallo, esto sugiere que la GA sí que interviene en el proceso de elongación del tallo, puesto que se acumula en la zona que estaba en crecimiento, pero no se acumula tanto en el ápice como ocurre con las auxinas, por lo que podríamos decir que su distribución estaría más proporcionada a lo largo del tallo.



**Figura 17:** Datos de la cuantificación de GA1 en el lote 03/06/2015, en el cual solo se cuantificaron las secciones S1a, S1b, S2, S3 y S4 de las líneas Mt, 20ox y L1. La cantidad de hormona viene indicada en nanogramos de hormona por cada gramo de tejido.

### 4.3.2 Análisis de GA4

La GA4 es la otra Giberelina activa, siendo en el Micro-Tom ésta la forma menos frecuente de la hormona. Los datos de su cuantificación (figura 18) muestran claramente cómo las nuevas líneas de Micro-Tom varían el genotipo con respecto al control. Al mirar los resultados vemos cómo los altos niveles de la hormona en línea 20ox nos impiden ver claramente la cantidad de hormona en las otras dos líneas debido a la diferencia tan significativa. Esto se debe a que al sobreexpresar la enzima 20oxidasa el precursor que GA12 tiende a formar el GA15 antes del GA53, haciendo que exista una mayor tendencia a producir la otra Giberelina activa (véase el apartado de síntesis de giberelinas en la introducción), es decir, que la enzima 13-oxidasa queda relegada a un segundo plano ante la sobreexpresión de la 20-oxidasa que ejerce su acción más rápidamente haciendo que la ruta de síntesis predominante en esta línea sea aquella en la que la enzima 13-oxidasa no participa. Del mismo modo vemos cómo el aumento en la cantidad de hormona se vuelve a dar sobre todo en las dos últimas secciones del tallo, viéndose unos valores de la hormona muy por encima de los observados antes ( figura 17) que oscilaban entre los 2 ng/g frente a los 50 ng/g que se ven ahora (figura 18). Al estudiar las distintas líneas por separado se ve el mismo aumento en la cantidad de la hormona en las dos últimas secciones, apoyando la teoría de que las giberelinas se acumulan al final de tallo durante la fase de crecimiento. Sin embargo en las líneas L1 y Mt las concentraciones de GA4 es mucho menor, rondando los 0,5 ng/g , ya que la GA1 es la forma activa predominante.

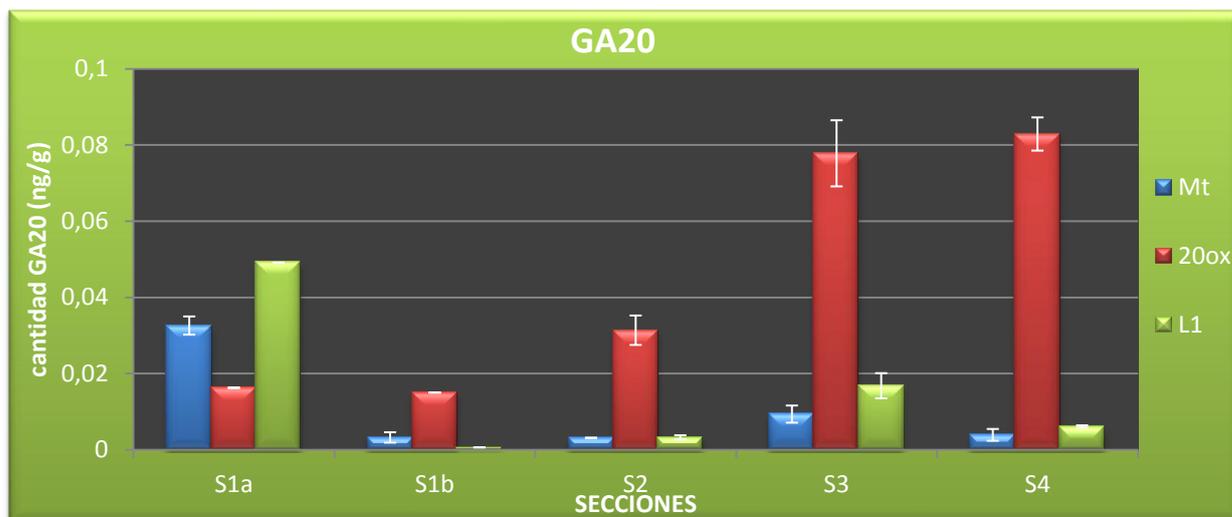


**Figura 18:** Datos de la cuantificación de GA4 en el lote 03/06/2015, en el cual solo se cuantificaron las secciones S1a, S1b, S2, S3 y S4 de las líneas Mt, 20ox y L1. La cantidad de hormona viene indicada en nanogramos de hormona por cada gramo de tejido.

### 4.3.3 Análisis de GA20

La GA20 es la hormona precursora de la GA1. Al analizar los resultados de su cuantificación (figura 19) podemos ver cómo la cantidad de esta es mucho menor que las observadas anteriormente con las otras hormonas, no llegando al 0,1 ng/g de tejido. Con la excepción de la primera sección se ve cómo la línea 20ox tiene una mayor cantidad de GA20

que la Mt y L1 como consecuencia de la sobreexpresión de la 20oxidasa. Así mismo se ve el aumento en la cantidad de la hormona a lo largo del tallo que hemos visto en los otros casos, al menos en esta línea 20ox. Por otro lado, en las otras dos líneas la sección que más cantidad de esta hormona muestra es la más baja, aunque en el caso de la línea L1 dicha sección se basa en la cuantificación de una réplica puesto que en las otras dos no aparecieron datos para esta hormona. Viendo estos resultados podemos suponer que en las líneas control y L1 únicamente se acumulan las GAs en su forma activa en los tejidos en crecimiento, mientras que sus precursores se mantienen a un nivel parecido a lo largo del tallo, con una concentración muy baja, como se puede apreciar.

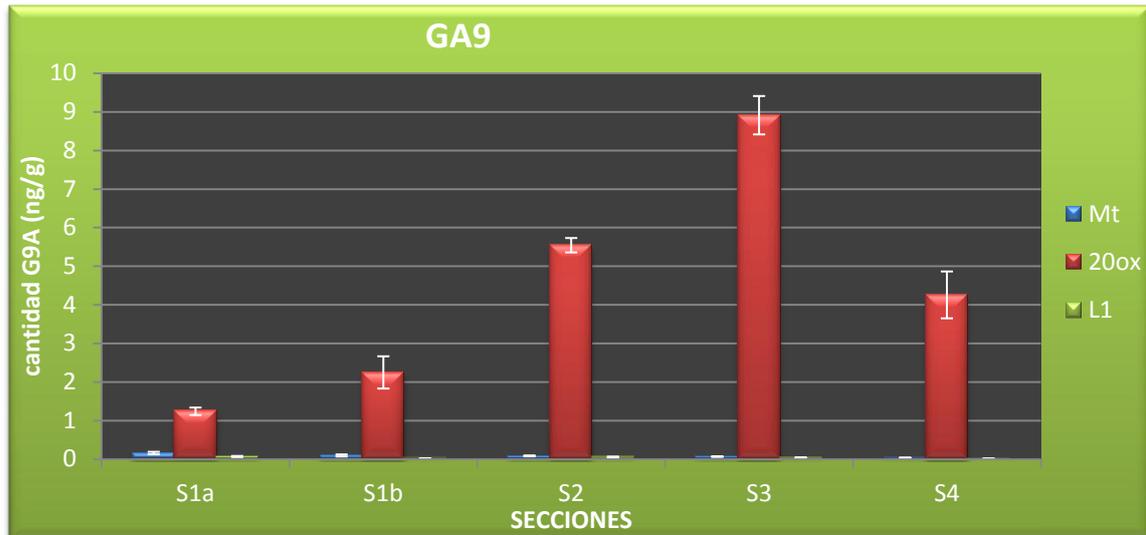


**Figura 19:** Datos de la cuantificación de GA20 en el lote 03/06/2015, en el cual solo se cuantificaron las secciones S1a, S1b, S2, S3 y S4 de las líneas Mt, 20ox y L1. La cantidad de hormona viene indicada en nanogramos de hormona por cada gramo de tejido.

#### 4.3.4 Análisis de la GA9

La GA9 es el precursor de la GA4, la otra Giberelina activa en Micro-Tom. Los resultados vistos en la cuantificación de esta hormona (figura 20) nos muestran como la sobreexpresión de la 20oxidasa en la línea 20ox varía la cantidad de hormona activa, pasando a ser la GA4 la más abundante. Esto ya se observó en el análisis de la GA4 y lo volvemos a ver con su precursor donde las grandes cantidades de este que existen en la línea 20ox nos impiden ver bien en la gráfica la cantidad de hormona que hay en las otras dos líneas. Al mirar detalladamente los datos del análisis de Mt y L1 se ve cómo la cantidad de GA9 es parecida a la cantidad de GA20, siendo esta última un poco mayor, así mismo su distribución por el tallo en estas dos líneas también es parecida. Las secciones más bajas son las que mayores niveles de la hormona precursora presentan, lo cual también se había visto en el anterior precursor, GA20 (tabla 19).

En el caso de la línea 20ox la mayor cantidad de la hormona no se ha visto en la última sección como de costumbre, pese a que sí se aprecia una cantidad ascendente de GA9 según se avanza por el tallo. Sin embargo, en la última sección la cantidad de hormona disminuye considerablemente.



**Figura 20:** Datos de la cuantificación de GA9 en el lote 03/06/2015, en el cual solo se cuantificaron las secciones S1a, S1b, S2, S3 y S4 de las líneas Mt, 20ox y L1. La cantidad de hormona viene indicada en nanogramos de hormona por cada gramo de tejido.

#### 4.4 Resultados de la tinción GUS

Los resultados de la tinción para localizar el IAA se muestran a través de distintas imágenes que nos ayudarán a intentar localizar la hormona. Para ello se hicieron fotos del tallo entero, un corte transversal del mismo y cortes transversales de distintas secciones del tallo (nudos y entrenudos). Estas fotos se obtuvieron a partir de plantas de la línea DR5 que se pusieron a germinar en los lotes del 24/03/2015 y del 27/03/2015 cuando llevaban 3 semanas desde que fueron puestas a germinar, es decir, al final de la fase vegetativa, como las plantas que hemos analizado para cuantificar.

##### 4.4.1 Tinción GUS de los tallos enteros de DR5

Al observar las fotos de los tallos de la línea DR5 tras la tinción (figura 21) se pueden observar cómo la hormona se acumula en las zonas correspondientes con los nudos del tallo y, sobre todo se aprecia una mayor coloración en la parte más baja del tallo, donde se encontraban los cotiledones y las primeras hojas verdaderas. Esto se contradice con las imágenes vistas más adelante (figura 22) en las que se observaba una mayor concentración en la parte superior del tallo, la más cercanas al ápice, aunque es cierto que dichas imágenes se toman de las partes internas del tallo. Esta acumulación observada en los nudos de los tallos (figura 21) nos muestra el papel importante que nuestra hormona podría tener en el desarrollo de las ramas laterales de la planta, limitándolo y promoviendo el crecimiento del tallo (sistema de ramificación simpodial). La posible explicación de por qué en este caso la parte más baja es la que más coloración muestra es que, a la hora de proceder a la tinción, esta es la parte que más tiempo estuvo en contacto con la solución de tinción, mientras que la parte superior hubo momentos en los que el contacto fue mucho menor. Por ello estas primeras imágenes del tallo son contrarias a las que les siguen y a la teoría de que las auxinas se acumulan principalmente en el ápice.

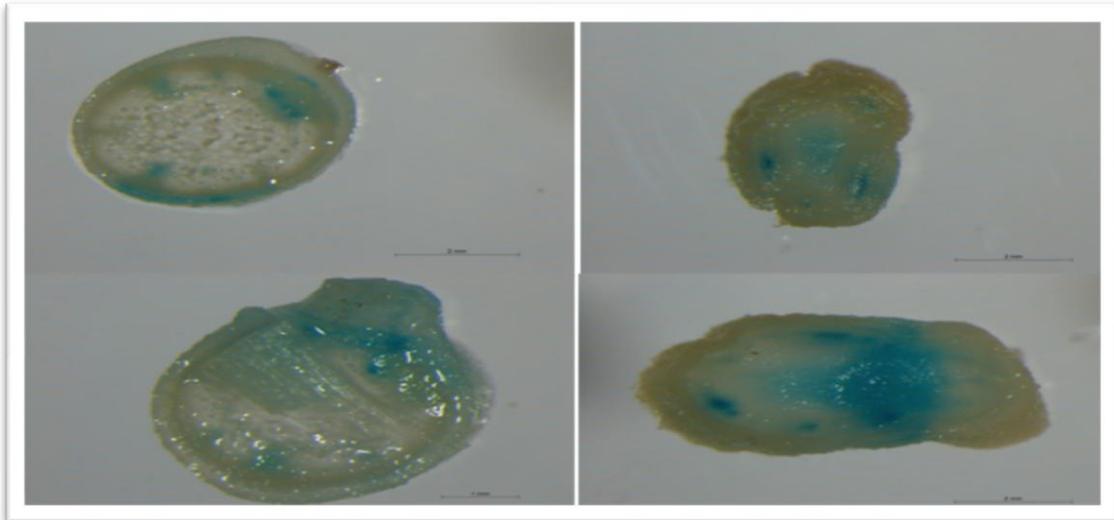


**Figura 21:** Imagen de las dos caras del mismo tallo de la línea DR5 del lote del 27/03/2015 tras haber realizado la tinción GUS.

#### **4.4.2 Tinción GUS de los cortes transversales de las secciones del tallo**

Al observar los cortes transversales hechos a lo largo del tallo (figura 22) se puede apreciar cómo en las dos secciones más próximas al ápice la coloración es más intensa que en las secciones más cercanas a la base, indicando una mayor concentración de IAA, lo cual se ve de manera muy clara en el último entrenudo antes del ápice donde casi toda la sección está coloreada.

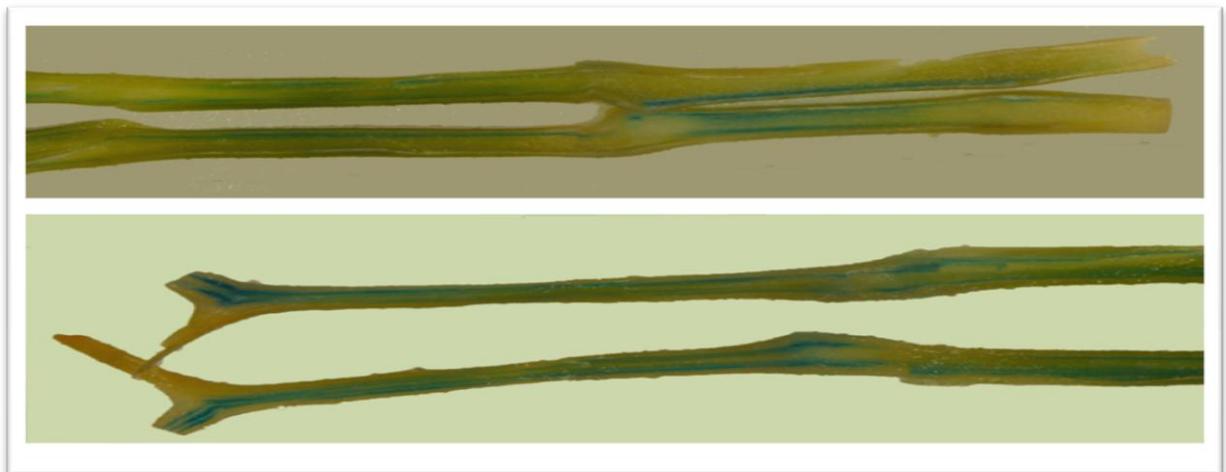
Así mismo se pueden hacer más observaciones. En los dos cortes que se corresponden con los nudos, especialmente en el nudo de las primeras hojas verdaderas, se ve como en las zonas donde las ramas laterales se estaban desarrollando hay una mayor concentración de la hormona. Esto también se observó en la imagen anterior (figura 21), y puede ser un indicador del papel de esta hormona en la limitación del crecimiento de las yemas axilares. Además en las secciones que se corresponden con los entrenudos se observan tres puntos, los cuales nos sugieren que el transporte polar que se lleva a lo largo del tallo y que se da de célula a célula se limita a unas zonas concretas dentro del tallo. Esto se podrá ver mejor en el corte transversal del tallo de DR5 (figura 23) donde se ven claramente unas líneas de transporte por todo el tallo. Con estas fotos se podría deducir que nuestra hormona cumple un papel importante en la limitación del crecimiento de las ramas laterales frente al crecimiento del tallo como indica, además, la mayor concentración de IAA en el ápice de la planta.



**Figura 22** : Imagen que muestra los cortes transversales del tallo del lote del 24/03/2015. Las dos superiores se corresponden con entrenudos, el de la izquierda más próximo a la raíz y la de la derecha más próxima al ápice. Las dos inferiores son nudos, el de la izquierda es el nudo de las primeras hojas verdaderas y el de la derecha del último nudo antes del ápice.

#### 4.4.3 Tinción GUS de los cortes transversales del tallo de DR5.

Tras realizar cortes transversales de los tallos de DR5 que habían sido teñidos obtuvimos las imágenes más reveladoras del transporte de IAA (figura 23). Al observar la imagen se pueden ver unas líneas azules que recorren todo el tallo. Esto se correspondería con las células transportando IAA a lo largo del mismo, limitándose a una zona concreta del tallo. Al observar más detalladamente se aprecia que la intensidad de la tinción es mayor en la parte superior del tallo, lo que indicaría una mayor concentración de la hormona en esta parte. Esto corroboraría la teoría de que esta hormona tiene un papel importante en el crecimiento de la planta puesto que se encuentra en mayores proporciones en las zonas que están creciendo en ese momento (se encuentra casi al final de la fase vegetativa) y que es la hormona inductora de la dominancia apical, puesto que la mayor intensidad observada en el ápice indica que este hace las veces de reservorio de esta hormona y limita el crecimiento de las yemas axilares.



**Figura 23:** Imágenes tomadas de los tallos DR5 del lote del 24/03/2015 tras la tinción GUS. La de arriba muestra un corte transversal de la base del tallo mientras que la de abajo se corresponde con un corte transversal de la parte superior

# **5. CONCLUSIONES**

Tras la cuantificación de las principales giberelinas activas y sus precursores mediante HPLC-MS/MS se ha comprobado que las líneas 20ox y L1 muestran el nivel de giberelinas adecuado tras los cambios que se han hecho en su genoma: la sobreexpresión de la enzima 20-oxidasa en el caso de la línea 20ox y el silenciamiento de la 2-oxidasa en el caso de la línea L1. Así, la primera línea presenta una mayor cantidad de las principales hormonas activas, GA1 y GA4, como consecuencia de la mayor presencia de la enzima 20-oxidasa, siendo, curiosamente, la GA4 la versión activa predominante, contrariamente a lo que pasa en tomate, donde GA1 es la principal Giberelina activa. La línea L1 presenta niveles ligeramente mayores que el control como consecuencia del silenciamiento de las enzimas encargadas de desactivar a las GAs activas

Utilizando estas líneas transformadas se ha visto la importancia de las giberelinas en el proceso de germinación. Esto se comprobó con la rápida y efectiva germinación de las líneas que tenían mayor presencia de giberelinas activas (20ox, Pro y L1) frente a la línea Micro-Tom que ha sido utilizada como control. También se vio que esta hormona puede tener un papel importante en el desarrollo de los cotiledones, pese a que en este caso los resultados no han sido tan concluyentes, puesto que la línea Pro, caracterizada por tener la respuesta de giberelinas activada de forma constitutiva (el represor DELLA ha sido eliminado), apenas los ha desarrollado. Sin embargo, la línea 20ox sí que ha mostrado mejores resultados que la línea control, lo cual indica que las giberelinas pueden tener importancia en el desarrollo de los cotiledones junto con otros factores.

Para ver cómo las giberelinas intervienen en la síntesis de auxinas se han utilizado las líneas descritas anteriormente. Tras la cuantificación mediante HPLC-MS/MS del nivel de auxinas se vio que la línea que mayor cantidad de giberelinas presenta (20ox) es la que tiene más cantidad de auxinas también, por lo que se puede deducir que las GAs intervienen en algún punto de la síntesis de auxinas. Sin embargo la falta de información de la biosíntesis de esta hormona nos impide saber en qué punto.

A partir de estos análisis de cuantificación de ambas hormonas también se vio que las dos tienen un papel activo en el proceso de elongación del tallo. Esto se deduce de la acumulación de estas dos hormonas en la parte final del mismo, que estaba en crecimiento en el momento es que las muestras fueron tomadas.

Por último se realizaron unas tinciones GUS, utilizando las líneas DR5, caracterizadas por tener una construcción DR5-GUS que nos permite localizar a las auxinas en los tejidos vegetales. Tras realizar estas tinciones pudimos situar esta hormona a lo largo del tallo y ver unos resultados que se complementaban con los vistos en las cuantificaciones: las auxinas se acumulan más en la parte final del tallo, la más cercana al ápice. Además también se vio cómo hay mayor presencia en los nudos del tallo, lo cual también puede estar implicado en la limitación del crecimiento de las yemas axilares propia del sistema de ramificación simpodial característico del tomate.

# **6. BIBLIOGRAFÍA**

- ALABADÍ, D.; AGÜERO, M.S.; PÉREZ-AMADOR, M.A. y CARBONELL, J. 1996. Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase and polyamines in tomato ovaries. Changes in pollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin and gibberellin. *Plant physiol.*, **112** (3), pp. 1237-1244
- BAK, S.; TAX, F.E.; FELDMANN, K.A.; GALBRAITH, D.W. y FEYEREISEN, R. 2001. CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **13**(1), pp. 101–111.
- BALUSKA, F.; PARKER, J. y BARLOW, P. 1993. A role of gibberellic acid in orienting microtubules and regulation of cell growth polarity in the maize root cortex. *Planta*, **191**(2), pp.149-157
- BASSEL, G.W.; MULLEN, R. T. y BEWLEY, J.D. 2008. Procera is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *Journal of Experimental Botany*, **59** (3), pp. 585–593
- DAVIES, P.J., editor (2010) Plant Hormones: their nature, occurrence and functions, In *Plant hormones*, pp-1-15. Springer Netherlands
- ESMON, C.A.; PEDMALE, U.V. y LISCUM, E. 2005. Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism. *Int. J. Dev. Biol.*, **49** (5/6), pp. 665-674.
- FAOSTAT. 2015. Departamento de estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Visto el 10 de junio de 2015. <http://faostat3.fao.org/home/S>
- FRIGERIO, M.; ALABADÍ, D.; PÉREZ-GÓMEZ, J.; GARCÍA-CÁRCEL, L.; PHILLIPS, A. L.; HEDDEN, P.; y BLÁZQUEZ, M. A. 2006. Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **142** (2), pp. 553-563.
- HARE, P.D.; SEO, H.S., YANG, J.Y. y CHUA, N.H. 2003. Modulation of sensitivity and selectivity in plant signaling by proteasomal destabilization. *Curr. opin. plant biology*, **6**(5), pp. 453-642
- HEDDEN, P. y PHILLIPS, A. L. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.*, **5** (12), pp. 523-530
- JACOBSEN, S.E. y OLSZEWSKI, N.E. 1991. Characterization of the arrest in anther development associated with gibberellin deficiency of the Gib-1 mutant tomato. *Plant physiol.*, **97** (1), pp. 409-414
- JENIK, P.D. y BARTON, M.K. 2005. Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *Development*, **132** (16) pp. 3577-3585.
- SUN, H.J.; UCHII, S.; WATANABE, S. y EZURA, H. 2006. A Highly Efficient Transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol.* **47**(3), pp. 426-431
- KOORNEEF, M.; BOSMA, T.D.G.; HANHART, C.; VAN DER VEEN, J.H. y ZEEVART, J.A.D. 1990. The isolation and characterization of gibberellin-deficient mutants in tomato. *Theor. Appl. Genet.*, **80** (6) pp. 852-857

- LEE, D.J. y ZEEVAART, J.A. 2005. Molecular cloning of GA-Oxidase3 from spinach and its ectopic expression in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiology*, **138** (1)pp. 243–254
- LIU, P.B. y LOY, J.B. 1976. Action of gibberellin acid on cell proliferation in the subapical shoot meristem of watermelon seedling. *Amer. J. of Bot.*, **63** (5) pp. 700-704
- LOMAX, T.L.; MUDAY, G.K. y RUBERY, P.H. 1995. Auxin transport. *Plant hormones*. pp. 509–530. Springer Netherlands
- LUDWIG-MÜLLER, J. y COHEN, J.D. 2002. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. *Physiologia Plantarum*, **115** (2)pp. 320–329.
- MAGOME, H. ;NOMURA, T. ;HANADA,A. ;TAKEDA-KAMIYA, N.; OHNISHI, T.; SHINMAD, Y.; KATSUMATA, T.; KAWAIDE,H.; KAMIYA, Y. y YAMAGUCHI, S. 2013. CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(5)pp. 1947–1952.
- MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G.J.; DIXON, M.S. y GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. 2006. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany* **57** (3)pp. 2037–2047.
- MARTÍNEZ-BELLO, L.; MORITZ, T. y LÓPEZ DÍAZ, I. 2015. Silencing C19-GA 2-oxidases induces parthenocarpic development and inhibits lateral branching in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*
- OGAWA, M.; HANADA, A.; YAMAUHI, Y.; KUWAHARA, A.; KAMIYA, Y. y YAMAGUCHI, S. 2003. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *The plant cell*, **15** (7), pp. 1591-1604
- OLSZEWSKI, K.; SUN, T.P.; y GUBLER, F. 2002. Gibberellin signaling, biosynthesis, catabolism and response pathways. *Plant cell*, **14** (suppl 1), pp. S61-S80
- OUYANG, J.; SHAO, X. y LI, J. 2000. Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **24** (3) pp. 327–333.
- PFLUGER, J. y ZAMBRYSKI, P. 2004. The role of SEUSS in auxin response and floral organ patterning. *Development*, **131** (19), pp. 4697–4707.
- PHARIS, R.P y KING, R.W. 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **36** (1)pp. 517-568
- POLLMANN, S.; NEU, D.; y WEILER, E.W.2003. Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry*, **62** (3), pp. 293–300.
- RAMEAU, C.; BERTHELOOT, J. ;LEDUC, N.; ANDRIEU, B.; FOUCHER, F. y SAKR, S.2014. Multiple pathways regulate shoot branching. *Frontiers in Plant Science*, **5**:741.

- ROSS J.J.; REID, J.B. y DUNGEY, H.S. 1992. Ontogenetic variation in levels of gibberellin A1 in *Pisum*. Implications for the control of stem elongation. *Planta*, **186** (2), pp. 166-171
- SCOTT, J.W. y HARBAUGH, B.K. 1989. Micro-Tom. A miniature dwarf tomato. *Florida Agricultural Experimental Station Circular*, **370**, pp. 1–6.
- SERRANI, J.C.; RUIZ-RIVERO, O.; FOS, M. y GARCÍA MARTÍNEZ, J.L. 2008. Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant Journal*, **56** (6), pp. 922–934
- SERRANI, J.C.; RAFAEL, S., RUIZ-RIVERO, O.; FOS, M. y GARCÍA MARTÍNEZ, J.L. 2007. Gibberellin Regulation of Fruit Set and Growth in Tomato. *Plant Physiol.*, **145** (1), pp. 246-257
- SILVERSTONE, A.L.; CIAMPAGLIO, C.N. y SUN, T. 1998. The Arabidopsis RGA genes encodes a transcriptional regulator repressing the Gibberellin signal transduction pathway. *The Plant Cell*, **10** (2), pp. 155–169,
- STASWICK, P.E.; SERBAN, B.; ROWE, M.; TIRYAKI, I.; MALDONADO, M.T.; MALDONADO, M.C. y SUZA, W. 2005. Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell*, **17** (2)pp. 616–627.
- SWARUP, R.; KARGUL, J.; MARCHANT, A.; ZADIK, D.; RAHMAN, A.; MILLS, R.; YEMM, A.; MAY, S.; WILLIAMS, L.; MILLNER, P.; TSURUMI, S.; MOORE, I.; NAPIER, R. ;KERR, I.D. y BENNETT, M.J. 2004. Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *The Plant Cell* **16**(11), pp. 3069-3083.
- TAYLOR, A. y COSGROVE, D.J. 1989. Gibberellic acid stimulation of cucumber hypocotyl elongation. Effect on growth, turgor osmotic pressure and cell wall properties. *Plant Physiol.* **90** (4), pp. 1335-1340
- THIMANN, K. y SKOOG, F. 1933. Studies on the growth hormone of plants III: the inhibitory action of the growth substance on bud development. *Pro. Natl. Acad. Sci.* **19** (7)pp. 714-716
- UEGUCHI-TANAKA, M.; NAKAJIMA, M.; MOTOYUKI, A. y MATSOUKA, M. 2007. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu. rev. Plant biol.* **58**, pp. 183-198
- VAN DOORN, W.G. y STEAD, A.D. 1997. Abscission of flowers and floral parts. *Journal of Experimental*, **48**(4), pp. 821-837
- WEISS, D. y ORI, N. 2007. Mechanisms of cross talk between Gibberellin and other hormones. *Plant physiology*, **144** (3), pp. 1240-1246
- WILLIGE, B. C.; ISONO, E.; RICHTER, R.; ZOURELIDOU, M. y SCHWECHHEIMER, C. 2011. Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, **23** (6)pp. 2184-2195.
- WOODWARD, A.W. y BARTEL, B.. 2005. Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany* **95** (5), pp. 707- 735.
- WOLBANG, C.M. y ROSS, J.J. 2001. Auxin promotes gibberellin biosynthesis in decapitated tobacco plants. *Planta*, **214** (1), pp. 153–157.

YAXLEY J.R. ;ROSS J.J.; SHERRIF L.J y REID J.B. 2001. Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. *Plant Physiol.*, **125** (2), pp. 627-633