



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**TESIS DOCTORAL**

*Análisis del cuajado y desarrollo partenocárpico del fruto en solanáceas:  
Identificación de genes implicados.*

Presentada por:

**LAURA PASCUAL BAÑULS**

**Para optar al título de Doctor por la  
Universidad Politécnica de Valencia**

Dirigida por:

**Dr. D. Joaquín Cañizares Sales**

**Dr. D. Fernando Nuez Viñals**

**Valencia, 2010**



## AGRADECIMIENTOS

Cuando miro hacia atrás me sorprende de haber llegado hasta aquí, y me doy cuenta de que no lo habría conseguido sin el apoyo de mucha gente que ha estado ahí para ayudar y a la que tengo mucho que agradecer.

En primer lugar querría agradecer a mis directores de tesis la dedicación que me han prestado. Al Dr. Fernando Nuez quiero agradecerle la oportunidad que me brindó de trabajar en el COMAV y de desarrollar esta tesis. Al Dr. Joaquín Cañizares le estoy muy agradecida por haber estado ahí en todo momento, para enseñar y aconsejar, sin su apoyo no habría llegado hasta aquí.

Me gustaría agradecer todo el apoyo que he recibido de la gente del departamento de Bioinformática del CIPF, a Ana Conesa y a Stefan Goetz por su ayuda con la anotación de los microarrays, y a Fatima Al-Shahrour por implantar nuestra anotación en el Babelomics. También me gustaría agradecer a Montse Plomer y María García su ayuda en el invernadero, y a Jose Blanca su apoyo con toda la parte bioinformática.

Además hay un montón de amigos y compañeros del COMAV que en un momento u otro me han ayudado con dudas varias o simplemente estando ahí para hablar y compartir los momentos más duros. Muchas gracias a Elena, Laura C, Laura A, Montse y Toya con las que he tenido el privilegio de compartir parte del camino. También a todos los que siguen por aquí dando guerra Pascual, Inma, Peio, Cris, Carmelo, Ana P, Nuria, Mariola, Javi, Alicia, Santi, Ana A... Para no dejarme a nadie mil gracias a todos.

Muchas gracias a toda mi familia, por aguantar lo peor de los nervios, en especial a mi madre y Oti por todas las fiambreras sin las que no habría sobrevivido. Y por supuesto muchas gracias a Robert por apoyarme en todo momento y creer en mí más que yo.



A mi abuela Amparo



## RESUMEN

El cuajado del fruto es uno de los procesos más importantes del desarrollo vegetal, de él dependen la reproducción y propagación de la planta, cuando se trata de especies silvestres, y la producción en el caso de las especies cultivadas. El estudio de los genes regulados durante este proceso es crucial para comprender mejor los mecanismos implicados y mejorar el cuajado, especialmente en condiciones ambientales adversas. El tomate, *Solanum lycopersicum*, además de ser uno de los principales cultivos de hortalizas, ha sido ampliamente utilizado en investigación, tanto básica como aplicada. Sin embargo, la mayoría de estudios del desarrollo del fruto en esta especie se han centrado en los procesos que tienen lugar durante la maduración y no han abordado el estudio del cuajado a gran escala. En este sentido, el estudio de materiales con capacidad partenocárpica tiene especial interés, facilita el estudio del cuajado sin interferencia de los procesos relacionados con el desarrollo del embrión y posibilita el estudio de los estadios tempranos del desarrollo del fruto independientemente de la polinización. Además, el empleo de estos materiales en la mejora es especialmente ventajoso puesto que permite obtener frutos incluso en ausencia de polinización y fecundación. En tomate existen diversas líneas con capacidad partenocárpica facultativa, entre ellas RP75/59 que es capaz de producir frutos sin semillas de las mismas características morfológicas que los frutos normales en ausencia de fecundación.

El objetivo general de esta tesis es estudiar el desarrollo del carpelo y el cuajado partenocárpico en tomate, lo que servirá de base para la mejora del cuajado en condiciones adversas. Con objeto de mejorar el conocimiento acerca de los procesos biológicos implicados en el cuajado del fruto se aislaron genes implicados en este proceso en tomate. Para ello se empleó la técnica de sustracción de genotecas y los datos de expresión génica de la especie modelo *Arabidopsis*. Al estudiar los genes aislados se comprobó que incluían genes relacionados con funciones como la respuesta a hormonas, que habían sido previamente relacionados con el cuajado del fruto. Pero también genes desconocidos, que constituyen una valiosa fuente de información para futuros estudios acerca del cuajado. Además, se realizó un estudio de conservación entre ambas especies y se encontró un alto grado de correlación, superior al 75%, lo que demuestra que existen una serie de mecanismos generales implicados en el cuajado del fruto en dicotiledóneas.

Para seguir profundizando en el estudio de los genes implicados en el cuajado del fruto y entender mejor los mecanismos exactos implicados en el desarrollo del carpelo, se realizó un análisis transcriptómico del desarrollo y cuajado en tomate. Se empleó una variedad control (UC82), en la que se analizaron el proceso de desarrollo del carpelo, cuajado del fruto y fecundación de manera conjunta. Esto ha permitido identificar 2842 genes regulados a lo largo de estos procesos. Mediante el análisis funcional del transcriptoma se han determinado las funciones biológicas implicadas en el cuajado, algunas de las cuales ya habían sido encontradas en el análisis realizado en *Arabidopsis*.

Por otro lado, empleando la línea partenocárpica RP75/59, se ha diseccionado a nivel transcriptómico el cuajado partenocárpico del fruto en tomate. Las diferencias de expresión entre esta línea y la variedad control no partenocárpica están centradas en el estadio de antesis. Probablemente porque a diferencia de lo que ocurre en la variedad control, donde el carpelo cesa su desarrollo hasta que tienen lugar la polinización y fecundación, en RP75/59 la antesis no es más que un estadio transitorio entre carpelo y fruto. En esta línea se han identificado 758 genes expresados diferencialmente con respecto a la variedad normal. El estudio detallado de los genes relacionados con hormonas, ha permitido determinar que en RP75/59 la alta concentración de GAs en el carpelo se debe a la sobre-expresión de la GA20-oxidasa 3. La concentración de GAs posibilita el desarrollo del fruto en ausencia de polinización y fecundación. Además, la sobre-expresión del gen ACO5 a lo largo de todos los estadios estudiados alteraría la síntesis de etileno lo que podría inducir la síntesis de auxinas.

El aislamiento de los genes directamente responsables del fenotipo RP75/59 sería muy interesante tanto desde el punto de vista científico, como aplicado, ya que facilitaría el empleo de este carácter en programas de mejora. Hasta la fecha no se habían conseguido realizar avances significativos en este sentido, probablemente debido a las dificultades a la hora de caracterizar este fenotipo. En esta tesis el análisis de la generación F2 desarrollada a partir de RP75/59 y UC82 ha permitido clarificar la partenocarpia de estos materiales y desarrollar una población segregante que servirá de base para realizar el cartografiado e identificación de genes implicados en el control de este carácter y en el cuajado y desarrollo del fruto.

## SUMMARY

Fruit set is one of the most important processes in plant development, as is needed, for reproduction of the plant, in wild species, and for production in crops. The study of the genes regulated during this process is key to understand the mechanisms involved and to improve fruit set, especially in harsh environments. Tomato, *Solanum Lycopersicum*, is one of the main vegetable's crop and has been used in basic and applied research. However, most of the studies about fruit development in this crop have been focused on the process of ripening and have not raised the global study of fruit set. About this topic, the research with parthenocarpic accessions is really interesting. The parthenocarpy provides a tool to study the fruit set without the background of the processes related with embryo development, and make possible the study of the first stages of fruit development without taking into account the exit of the pollination. Besides those materials are really useful in crop breeding as allowed the development of fruits even without pollination and fecundation. In tomato there are several accessions with facultative parthenocarpy, such as RP75/59, that can set seedless fruits equal to the seeded ones.

The general topic of this thesis is to study carpel development and parthenocarpic fruit set in tomato, those studies will be the basis to improve fruit set in harsh conditions. To improve the knowledge of the biological processes involved in fruit set, the genes implicated in this process in tomato have been isolated in tomato from a library subtraction of cDNA libraries and from expression data of the model species *Arabidopsis*. When the genes isolated were analyzed, were discovered genes related to response to hormones, that have been previously related with fruit set. But also unrelated genes, that could be a valuable source of information for future studies about fruit set. Besides, an analysis of conservation between tomato and *Arabidopsis* showed a high degree of correlation, greater than 75%, which showed that there are general mechanisms involved in dicotyledonae fruit set.

To deepen into the study of the genes involved in fruit set and the mechanisms of carpel development, a transcriptomic analysis was made in tomato using UC82 as a control variety. With that variety, carpel development, fruit set and fecundation were analyzed together. We were able to identify 2842 genes regulated along those processes. The functional analysis of those genes has allowed to identify the biological functions related with fruit set, some of which have been previously identified in the analysis made with *Arabidopsis*.

The parthenocarpic line RP75/59 has been analyzed at transcriptomic level to study the parthenocarpic fruit set in tomato. The differences between this line and the control variety UC82 non parthenocarpic have been found mainly at anthesis. In contrast to the normal development where the carpel stops its development at anthesis until pollination and fecundation take place, in RP75/59 anthesis was just one step between carpel and fruit. With that line 758 genes regulated differently with respect to the control line were identified. The analysis of the genes related with hormones revealed that in RP75/59 the high concentration in GAs is due to the higher expression of the GA20-oxidase 3. The high concentration of GAs allowed the development of fruits in absence of pollination and fecundation. Besides the high expression of the ACO5 gene during all the stages analyzed would alter ethylene biosynthesis and might induce auxin synthesis.

The isolation of the genes that cause the RP75/59 phenotype would be really interesting, from a scientific and applied point, as would allow the inclusion of this character in breeding programs. Until now there has not been any significant advances in that direction, probably due to the problems when characterizing this phenotype. During the development of this thesis, the analysis of a segregating offspring from the cross between RP75/59 and UC82 was used to clarify the parthenocarpic phenotype in this accession and to develop a segregating population, that will be the basis for the mapping and isolation of the genes involved in the control of the character and fruit set and development.

## RESUM

El quallat del fruit és un dels processos més importants del desenvolupament vegetal, d'ell depenen la reproducció i propagació de la planta, quan es tracta d'espècies silvestres, i la producció en el cas de les espècies cultivades. L'estudi dels gens regulats durant este procés és crucial per a comprendre millor els mecanismes implicats i millorar el quallat, especialment en condicions ambientals adverses. La tomaca, *Solanum lycopersicum*, a més de ser un dels principals cultius d'hortalisses, ha sigut àmpliament utilitzat en investigació, tant bàsica com aplicada. No obstant això, la majoria d'estudis del desenvolupament del fruit en esta espècie s'han centrat en els processos que tenen lloc durant la maduració i no han abordat l'estudi del quallat a gran escala. En este sentit, l'estudi de materials amb capacitat partenocàrpica té especial interès. Facilita l'estudi del quallat sense interferència dels processos relacionats amb el desenvolupament de l'embrió i possibilita l'estudi dels estadis primerencs del desenvolupament del fruit independentment de la pol·linització. A més, l'ocupació d'estos materials en millora és especialment avantatjós ja que permet obtindre fruits inclús en absència de pol·linització i fecundació. En tomaca hi ha diverses línies amb capacitat partenocàrpica facultativa, com RP75/59 que és capaç de produir fruits sense llavors de les mateixes característiques morfològiques que els fruits normals en absència de fecundació.

L'objectiu general d'esta tesi és estudiar el desenvolupament del carpel i el quallat partenocàrpic en tomaca, la qual cosa servirà de base per a la millora del quallat en condicions adverses. A fi de millorar el coneixement sobre els processos biològics implicats en el quallat del fruit es van aïllar gens implicats en este procés en tomaca. Per a això es va emprar la tècnica de sostracció de genoteques i les dades d'expressió gènica de l'espècie model *Arabidopsis*. A l'estudiar els gens aïllats es va comprovar que incloïen gens relacionats amb funcions com la resposta a hormones, que havien sigut prèviament relacionats amb el quallat del fruit. Però també gens desconeguts, que constitueixen una valuosa font d'informació per a futurs estudis sobre el quallat. A més, es va realitzar un estudi de conservació entre ambdós espècies i es va trobar un alt grau de correlació, superior al 75%, el que demostra que hi ha una sèrie de mecanismes generals implicats en el quallat del fruit en dicotiledònies.

Per a continuar aprofundint en l'estudi dels gens implicats en el quallat del fruit i entendre millor els mecanismes exactes implicats en el desenvolupament del carpel, es va realitzar una

anàlisi transcriptòmic del desenvolupament i quallat en tomaca. Es va utilitzar una varietat control (UC82), en la que es van analitzar el procés de desenvolupament del carpel, quallat del fruit i fecundació de manera conjunta. Açò ha permès identificar 2842 gens regulats al llarg d'estos processos. Per mitjà de l'anàlisi funcional del transcriptoma s'han determinat les funcions biològiques implicades en el quallat, moltes de les quals ja havien sigut trobades en l'anàlisi realitzat en *Arabidopsis*.

D'altra banda, utilitzant la línia partenocàrpica RP75/59, s'ha inspeccionat a nivell transcriptòmic el quallat partenocàrpic del fruit en tomaca. Les diferències d'expressió entre esta línia i la varietat control no partenocàrpica estan centrades en l'estadi d'antesi. Probablement perquè a diferència del que ocorre en la varietat control, on el carpel cessa el seu desenvolupament fins que tenen lloc la pol·linització i fecundació, en RP75/59 l'antesi no és més que un estadi transitori entre carpel i fruit. En esta línia s'han identificat 758 gens expressats diferencialment respecte a la varietat normal. L'estudi detallat dels gens relacionats amb hormones, ha permès determinar que en RP75/59 l'alta concentració de GAs en el carpel es deu a la sobre-expressió de la GA20-oxidasa 3. La concentració de GAs possibilita el desenvolupament del fruit en absència de pol·linització i fecundació. A més, la sobre-expressió del gen ACO5 al llarg de tots els estadis estudiats alteraria la síntesi d'etilè el que podria induir la síntesi d'auxines.

L'aïllament dels gens directament responsables del fenotip RP75 59/seria molt interessant tant des del punt de vista científic, com aplicat, ja que facilitaria l'ocupació d'este caràcter en programes de millora. Fins a la data no s'havien aconseguit realitzar avanços significatius en este sentit, probablement a causa de les dificultats a l'hora de caracteritzar este fenotip. En esta tesi l'anàlisi de la generació F2 desenrotllada a partir de RP75/59 i UC82 ha permès aclarir la partenocàrpia d'estos materials i desenrotllar una població segregant que servirà de base per a realitzar el cartografiat i identificació de gens implicats en el control d'este caràcter i en el quallat i desenvolupament del fruit.

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. El tomate: importancia como especie modelo y especie cultivada	3
2. Desarrollo floral	5
2.1 Determinación del meristemo floral y desarrollo de la inflorescencia	6
2.2 Desarrollo de la flor	7
2.3 Influencia ambiental en el desarrollo floral	10
3. Cuajado y desarrollo del fruto	11
3.1 Fases del desarrollo del fruto	12
3.2 Desarrollo del fruto en tomate	13
3.3 Cuajado del fruto en tomate	15
3.3.1 Papel de las hormonas en el cuajado y desarrollo del fruto en tomate	17
3.3.2 Caracterización de genes implicados en el cuajado del fruto en tomate	21
3.3.3 Influencia ambiental en el cuajado del fruto en tomate, problemas y soluciones	24
4. Desarrollo del fruto en ausencia de fecundación	25
4.1 Apomixis	26
4.2 Partenocarpia	26
4.3 Inducción del desarrollo partenocárpico en tomate	27
4.3.1 Partenocarpia inducida mediante fitoreguladores	28
4.3.2 Partenocarpia mediante transgénesis	28
4.4 Fuentes naturales de partenocarpia en tomate	30
4.4.1 Partenocarpia en las líneas ITV-line 1 y IL5-1	31
4.4.2 Partenocarpia en <i>Soressi</i> o <i>Montfavert 191</i>	32
4.4.3 Partenocarpia en <i>Severianin</i>	34
4.4.4 Partenocarpia en RP75/59	36
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>43</b>
1. Material vegetal	45
2. Sustracción de genotecas	48

## Índice

3. Extracción de ARN total, retrotranscripción y PCR cuantitativa	51
4. Hibridación del Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array	54
5. Análisis de microarrays, identificación de genes diferenciales	54
5.1 Análisis del Affymetrix ATH1 <i>Arabidopsis</i> Array	54
5.1.1 Identificación de genes ortólogos y análisis de conservación entre especies	56
5.2 Análisis del Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array	57
6. Análisis funcionales	58
6.1 Análisis funcional de la sustracción y del Affymetrix ATH1 <i>Arabidopsis</i> Array	59
6.2 Anotación y análisis funcional del Affymetrix GeneChip Tomato Array	60
7. Caracterización de una F2 segregante para la partenocarpia de RP75/59	60
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>63</b>
1. Identificación de genes implicados en el cuajado del fruto en tomate y <i>Arabidopsis</i>	65
1.1 Búsqueda de genes implicados en el cuajado del fruto en tomate	65
1.2 Búsqueda de genes implicados en el cuajado y desarrollo temprano del fruto en <i>Arabidopsis</i>	70
1.3 Comparación de la expresión génica en tomate y <i>Arabidopsis</i>	71
1.3.1 Conservación entre tomate y <i>Arabidopsis</i>	71
1.3.2 Conservación entre <i>Arabidopsis</i> y tomate	73
1.4 Análisis funcional del cuajado del fruto	79
1.4.1 Análisis funcional de los genes aislados en tomate mediante sustracción de genotecas	79
1.4.2 Análisis funcional de los genes expresados diferencialmente en <i>Arabidopsis</i>	80
2. Análisis transcriptómico del desarrollo del carpelo en tomate	83
2.1 Aislamiento de genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo en tomate	84
2.2 Aislamiento de genes expresados diferencialmente a lo largo del desarrollo del carpelo en RP75/59	87
2.3 Validación de los resultados del microarray mediante PCR cuantitativa	89
2.4 Anotación del Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array	90
2.5 Estudio funcional de los genes diferenciales	91
2.5.1 Genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo	92

2.5.2 Genes expresados diferencialmente en RP75/59 a lo largo del desarrollo del carpelo	93
2.6 Genes relacionados con el ciclo celular	94
2.7 Genes relacionados con hormonas	97
3. Estudio de la expresión génica durante el cuajado partenocárpico en RP75/59	103
3.1 Aislamiento de genes expresados diferencialmente durante el cuajado partenocárpico del fruto en RP75/59	104
3.2 Análisis funcional de genes expresados diferencialmente durante el cuajado partenocárpico del fruto en RP75/59	107
3.3 Análisis de genes relacionados con el ciclo celular	108
3.4 Análisis de genes relacionados con hormonas	110
4. Construcción y caracterización de una población F2 para la localización de los genes responsables de la partenocarpia de RP75/59	114
4.1 Caracterización de la F2 procedente del cruce UC-82 x RP75/59	114
4.2 Clasificación de las plantas de la F2 atendiendo a las características de los frutos	116
4.3 Correlación del fenotipo de la F2 con la expresión génica	119
4.4 Ajustes de los datos a los diferentes modelos genéticos descritos	122
4.4.1 Ajuste al modelo de Vardy y colaboradores	123
4.4.2 Ajuste al modelo de Nuez y colaboradores	124
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>127</b>
1. Aislamiento de genes implicados en el cuajado del fruto en especies modelo	130
1.1 Sustracción de genotecas de flores de tomate	130
1.2 Aislamiento de genes expresados diferencialmente en tomate usando la ortología con <i>Arabidopsis</i>	131
1.3 Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados	133
2. Análisis del transcriptoma del carpelo de líneas partenocárpicas y no partenocárpicas de tomate	134
2.1 Análisis transcriptómico del desarrollo del carpelo y cuajado del fruto en tomate	135
2.2 Análisis transcriptómico del cuajado partenocárpico del fruto en tomate	136
2.3 Análisis funcional de los genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo y cuajado partenocárpico del fruto	137

## *Índice*

2.4 Regulación de los genes relacionados con el ciclo celular a lo largo del desarrollo del carpelo y cuajado partenocárpico del fruto	139
2.5 Regulación de los genes relacionados con hormonas a lo largo del desarrollo del carpelo y cuajado partenocárpico del fruto	140
3. Construcción y caracterización de una población F2 para la localización de los genes responsables de la partenocarpia de RP75/59	146
3.1 Caracterización de una población segregante para la partenocarpia	147
3.2 Ajuste de la segregación a los modelos anteriormente propuestos	148
4. Regulación del cuajado del fruto	150
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>153</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>159</b>
<b>VII. ANEXOS</b>	<b>179</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. El tomate: importancia como especie modelo y especie cultivada

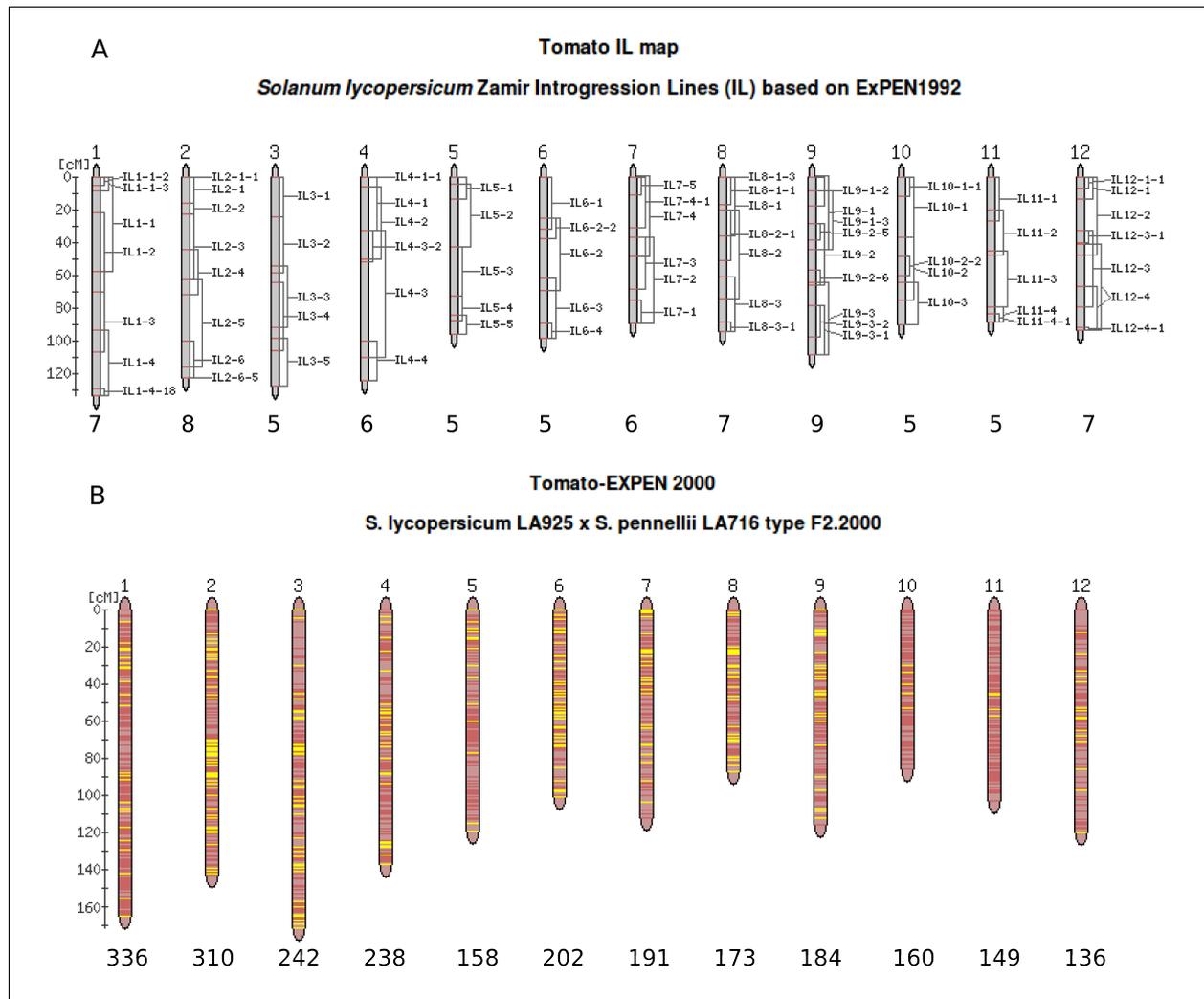
El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), además de ser uno de los principales cultivos de hortalizas, ha sido ampliamente utilizado en investigación, tanto básica como aplicada. Pertenece a la familia de las solanáceas, que incluye otras especies cultivadas de gran importancia como pimiento, patata, berenjena, tabaco y petunia. Aunque la especie modelo por excelencia de las plantas dicotiledóneas es *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, se ha considerado necesario utilizar otra especie para el estudio del desarrollo de frutos carnosos. El tomate es un buen candidato, debido en gran medida a su importancia económica como especie cultivada a nivel mundial lo que facilita la aplicación directa de los descubrimientos realizados. Presenta muchas ventajas para su empleo como especie modelo: es una especie diploide de genoma pequeño, con ciclo de vida corto, fácil control de la polinización e hibridación, alta fertilidad, posibilidad de propagación asexual mediante esquejes, facilidad de regeneración y transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Townsend) Conn.

Además, los numerosos estudios y programas de mejora realizados en tomate han permitido el desarrollo de un gran número de mutantes y variedades que afectan a los distintos aspectos del desarrollo y maduración del fruto. De manera que en la actualidad existen numerosos recursos fitogenéticos de esta especie y de especies altamente relacionadas. Por ejemplo, en el TGRC (<http://tgrc.ucdavis.edu/index.aspx>) disponen de una colección de más de 3500 entradas que incluyen, variedades comerciales y tradicionales, mutantes monogénicos, especies silvestres relacionadas y líneas de introgresión con algunas de las especies silvestres (Figura 1A). En el COMAV ([http://www.comav.upv.es/comav\\_banco.html](http://www.comav.upv.es/comav_banco.html)) disponen de más de 2000 entradas que incluyen tanto entradas cultivadas como de especies silvestres. Por todo ello se dispone de un modelo muy útil para profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en las últimas fases de desarrollo del fruto (Moore *et al*, 2002).

También hay disponibles un gran número de herramientas moleculares en esta especie (recapituladas en <http://sgn.cornell.edu>). Mapas genéticos de alta densidad (Figura 1B) y mapas físicos, en los que han sido mapeados más de 2000 loci. Más de 300000 ESTs que incluyen 73 genotecas y colecciones de genotecas genómicas de YACs y BACs. Cuatro microarrays para el

## Introducción

estudio de expresión génica, TOM1 de ADNc y de oligonucleotidos TOM2, Agilent Tomato Array y Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array. Estos recursos genómicos van a continuar incrementándose con el avance del proyecto de secuenciación del genoma de esta especie, desde diciembre del 2009 se dispone de un primer borrador del genoma.



**Figura 1. A.** Mapa genético basado en las líneas de introgresión de *Solanum penelli* en tomate desarrolladas por Zamir. **B.** Mapa genético de tomate (Tomato-EXPEN 2000), contiene 2506 marcadores que incluyen, CAPs, RFLPs, SNPs y SSRs (<http://sgn.cornell.edu>).

Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre con otras especies modelo donde los avances realizados deben extrapolarse a especies cultivadas, en tomate la aplicación de los avances que se realizan en el laboratorio es directa por lo que cualquier avance tiene gran relevancia económica.

Esta especie es la octava en importancia mundial (Tabla 1), con una producción de más de cien mil millones de toneladas al año para consumo en fresco y procesado. Todo ello hace del tomate un excelente modelo para el estudio del desarrollo del fruto y del cuajado (el estudio del inicio de la transformación del carpelo en fruto), que es un paso clave en la producción agrícola y un proceso idóneo para el estudio del desarrollo vegetal.

**Tabla1.** Producción mundial de cultivos en el 2007 según la FAO (<http://www.fao.org>).

<b>Producto</b>	<b>Producción (1000\$ Int)</b>	<b>Producción (1000 T)</b>
<b>Arroz cáscara</b>	130994000	659590623
<b>Trigo</b>	72917380	605994942
<b>Soja</b>	44666580	220532612
<b>Maíz</b>	38394490	791794584
<b>Papas, patatas</b>	34821630	309344247
<b>Caña de azúcar</b>	32090140	1590701770
<b>Uvas</b>	31183820	67221000
<b>Tomates</b>	30327200	129942416
<b>Yuca</b>	14051950	214515149
<b>Bananos</b>	12065270	85855856
<b>Remolacha azucarera</b>	10907030	246713216
<b>Sandías</b>	9491603	97434562
<b>Coles y otras crucíferas</b>	9417104	68918014
<b>Batatas, boniatos</b>	7073337	107667971
<b>Cebada</b>	3265138	133431341

## 2. Desarrollo floral

Durante el desarrollo de las plantas podemos distinguir dos estadios, el desarrollo vegetativo y el desarrollo reproductivo. El desarrollo reproductivo está controlado de manera endógena y por estímulos externos. Cuando las condiciones ambientales son adecuadas, el meristemo vegetativo se transforma en meristemo floral dando lugar a la inflorescencia. A partir del mismo se diferenciarán los primordios florales (Krizek y Fletcher, 2005). El desarrollo de estos primordios florales seguirá hasta llegar a la fase de antesis, donde el desarrollo puede continuar por dos vías, la senescencia o la transformación en un fruto tras la fecundación.

## 2.1 Determinación del meristemo floral y desarrollo de la inflorescencia

La determinación del meristemo floral inicia el ciclo reproductivo de la planta. En *Arabidopsis thaliana*, al tratarse de una planta de día largo, el fotoperiodo tiene una gran influencia en este proceso. En esta especie se han caracterizado numerosos mutantes que afectan a la transición floral (Boss *et al*, 2004) y se conocen las diferentes rutas que integran los factores ambientales y genéticos implicados en determinar la transición floral. Sin embargo, no todos estos resultados son extrapolables a otras especies (Quinet *et al*, 2006). Por ejemplo, en petunia el gen homólogo a *FRUITFULL* es necesario para la transición floral, cosa que no ocurre en *Arabidopsis* (Immink *et al*, 1999).

En tomate, a diferencia de *Arabidopsis*, la transición floral no depende del fotoperiodo. La diferenciación floral suele iniciarse dentro de las tres semanas siguientes a la expansión de los cotiledones, cuando la planta tiene entre 6 y 12 hojas. El periodo sensible durante el cual las condiciones ambientales determinan el momento exacto de la transición floral dura aproximadamente nueve días y comienza con la expansión de los cotiledones (Calvert, 1957). Durante esta fase las bajas temperaturas aceleran la determinación. La radiación solar también influye, de manera que cuanto mayor es la radiación solar la influencia de la temperatura es menor (Uzum, 2006). Además de las condiciones ambientales, las diversas hormonas vegetales también parecen influir en la determinación floral; sin embargo, su papel no está claro, ya que el efecto de los mismos agentes hormonales parece variar en función del método de aplicación (Heuvelink, 2005).

Una vez producida la transición floral el meristemo apical se transforma en meristemo floral. El crecimiento vegetativo seguirá a partir de la yema axilar de la hoja más cercana al meristemo apical, desplazando el meristemo floral. Finalmente, la inflorescencia queda situada en el lateral del tallo. El nuevo meristemo apical dará lugar a otro meristemo vegetativo a las 3 hojas y la planta continuará el crecimiento por la siguiente yema lateral. En las variedades de crecimiento indeterminado este proceso se repite indefinidamente, en las de crecimiento determinado, tras producir un cierto número de inflorescencias, el crecimiento continúa a partir de las yemas axilares de la base del tallo (Heuvelink, 2005). El tipo de crecimiento, y por tanto la

formación de los meristemos florales, está controlado genéticamente. Cuando el alelo recesivo del gen *SELF-PRUNING (SP)* se encuentra en homocigosis, las plantas presentan crecimiento determinado. Este gen es ortólogo del gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* de *Arabidopsis* cuya pérdida de función provoca la producción de inflorescencias con menor número de flores. Esto demuestra que a pesar de las diferencias existentes en la determinación floral, existen una serie de genes implicados en el proceso de la determinación floral comunes entre las dos especies, aunque debido a las diferencias en el sistema de crecimiento la acción de estos genes no sea equivalente (Pnueli *et al*, 1998).

Tras la determinación del meristemo floral, éste dará lugar a cierto número de primordios florales. La cantidad de flores por inflorescencia varía entre diversas especies e incluso dentro de especie. En tomate, el tamaño de las inflorescencias está influido por las condiciones ambientales, las condiciones de desarrollo de la planta y por factores genéticos. En esta especie el tamaño de las inflorescencias oscila entre una única flor, en el caso del mutante *sft (single flower trust mutant)*, y 200 en el mutante *s (compound inflorescence mutant)* (Quinet *et al*, 2006). Las flores se agrupan en racimos, la primera flor se forma de la yema apical y las demás se desarrollan lateralmente por debajo de la primera, alrededor de un eje principal (Chamarro, 1995).

## 2.2 Desarrollo de la flor

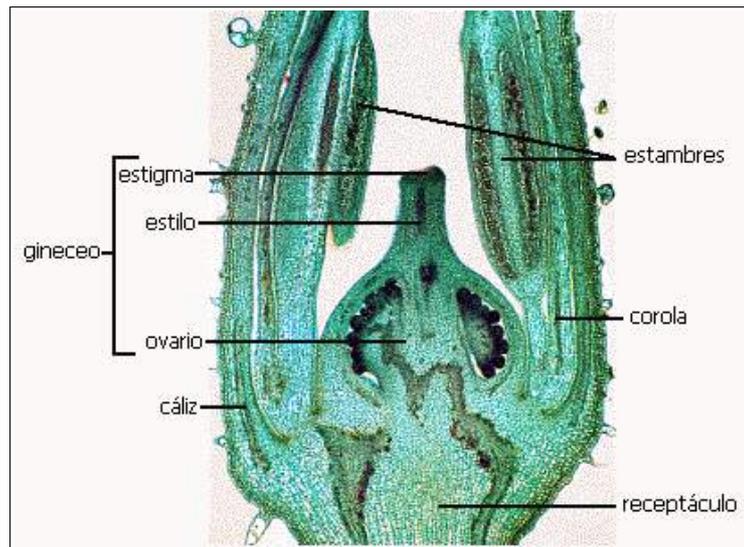
El proceso de desarrollo de la flor a partir del primordio floral ha sido estudiado sobre todo en las especies modelo *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* (L.). A partir los estudios en estas especies se desarrolló el modelo ABC, que explica el control genético de la diferenciación de los diversos órganos florales. Los genes tipo A controlan la diferenciación de los sépalos, los tipo A y B, expresados conjuntamente, dan lugar a los pétalos. B y C determinan estambres y cuando se expresan solamente los genes C se forman los carpelos (Ma y dePamphilis, 2000). Descubrimientos posteriores han ampliado el modelo para incluir genes tipo D, que determinan la formación de los óvulos, y tipo E, que se expresan en pétalos, estambres y carpelo (Ferrario *et al*, 2004).

## Introducción

Recientemente el desarrollo del microarray ATH1 de *Arabidopsis*, que contiene más de 22000 genes, ha permitido realizar estudios globales de los cambios que tienen lugar durante el desarrollo de la flor. Henning y colaboradores (2004) identificaron más de 1800 genes regulados durante el desarrollo reproductivo. Schmid y colaboradores (2005) analizaron la expresión global durante diversos procesos de desarrollo de *Arabidopsis*, proporcionando una herramienta para analizar el desarrollo de la flor a nivel global. Sin embargo, no todos los resultados son extrapolables a otras especies. En tomate por ejemplo, tras inhibir el gen *AGAMOUS* en el tercer verticilo se forman unos estambres petaloides, mientras que en *Arabidopsis* la ausencia de *AGAMOUS* da lugar a pétalos normales en lugar de estambres (Pnueli *et al*, 1994a). Además existe una gran diversidad floral dentro de las diversas especies vegetales, incluso dentro de las dicotiledóneas.

En *Arabidopsis*, el desarrollo floral se divide en 13 fases (Smyth *et al*, 1990) mientras que en tomate algunos estudios hablan de 20 etapas (Brukhin *et al*, 2003). Para poder extrapolar los descubrimientos de las especies modelos y caracterizar las diferencias existentes entre las distintas especies Buzgo y colaboradores (2004) proponen dividir el desarrollo floral en 10 fases. Cada una de las fases marca el inicio de los procesos más importantes del desarrollo floral: formación de la inflorescencia y primordio floral, iniciación del verticilo exterior (sépalos), iniciación de los verticilos interiores (pétalos), iniciación de los estambres, iniciación del carpelo, microsporogénesis, iniciación de los óvulos, meiosis masculina, meiosis femenina y antesis. Estas fases han sido caracterizadas en *Solanum pimpinellifolium* (L.), especie muy cercana a tomate (Xiao *et al*, 2009). En esta especie, la formación del carpelo comienza aproximadamente 6 días tras la aparición del primordio floral, momento en el cual los pétalos recubren los estambres. En este momento aparece una columna central que posteriormente dará lugar a las cavidades locales. Ocho días después de la iniciación del primordio floral la columna continua su desarrollo aumentando su longitud y se observan los carpelos fusionados en cuya parte superior comienza la formación del estilo. En este momento comienza el desarrollo de la placenta, de la que un día después emergerán los óvulos. A partir de este punto todas las partes del carpelo ya han comenzado su diferenciación. El desarrollo de los estambres comienza un poco antes, a los 5 días de la iniciación del primordio floral. Pero la microsporogénesis no empieza hasta 3 días después, cuando ya ha comenzado el desarrollo de todos los verticilos

florales y los sépalos recubren el primordio floral. A partir de estas fases de botón floral hasta la antesis, que coincide con la apertura de los pétalos, tiene lugar el desarrollo de los gametofitos masculino y femenino (Figura 2). Este periodo es uno de los más críticos del desarrollo de la flor y está muy influenciado por las condiciones ambientales. De manera que condiciones adversas pueden llevar a esterilidad e incapacidad de polinización y fecundación, impidiendo el desarrollo del fruto.



**Figura 2.** Corte longitudinal de flor de tomate ([http://www.uri.edu/artsci/bio/plant\\_anatomy](http://www.uri.edu/artsci/bio/plant_anatomy)).

Una vez finalizado el desarrollo de la flor en tomate se obtiene como resultado una flor hexámera (Figura 3). El cáliz es corto y está unido a seis sépalos verdosos, la corola consiste en un pequeño cono que se divide en seis pétalos de un brillante color amarillo. El androceo está formado por seis anteras bilobuladas que se encuentran unidas formando el cono estaminal, en cuyo interior se encuentra el pistilo. El gineceo está compuesto por entre 2 y 7 carpelos de color verde, que están fusionados en el centro de la flor.



**Figura 3.** Flor de tomate en antesis.

### 2.3 Influencia ambiental en el desarrollo floral

Además de en la determinación del meristemo floral las condiciones ambientales influyen en los siguientes pasos del desarrollo reproductivo. En tomate, la temperatura juega un papel crucial en la conformación de la arquitectura de la inflorescencia y el tamaño de la misma. Las bajas temperaturas nocturnas durante la iniciación de la inflorescencia favorecen la ramificación de la misma. Sin embargo, las altas temperaturas durante el día promueven la formación de inflorescencias con mayor número de flores (Karapanos *et al*, 2008).

En cuanto al desarrollo de la flor propiamente dicha, en tomate la temperatura sigue jugando un papel crucial. Una temperatura media de 20°C acelera el desarrollo floral y promueve el desarrollo temprano de la segunda inflorescencia, mientras que temperaturas bajas producen anomalías en el desarrollo de los órganos florales. Cuando se compara el desarrollo de la flor en plantas cultivadas en condiciones de 26°C día/18°C noche y plantas cultivadas a 17°C/7°C, en estas últimas se dan cambios en el número de órganos florales que afectan sobre todo a los verticilos reproductivos. Además se producen alteraciones en el patrón de fusión de los órganos y en menor medida cambios de identidad de órganos florales. Todos estos cambios son más pronunciados en los verticilos reproductivos y están relacionados con cambios en niveles de expresión de factores de transcripción (Lozano *et al*, 1998).

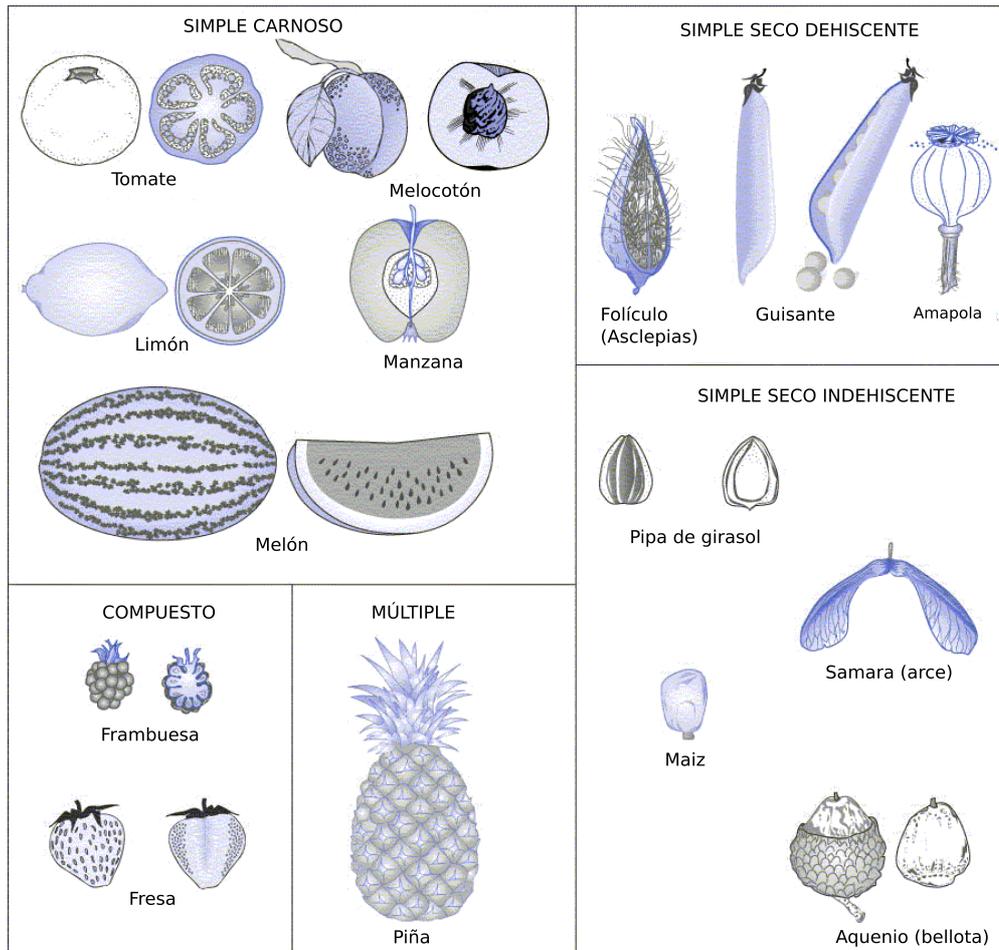
En cuanto al desarrollo de los gametofitos, proceso del que depende en gran medida el éxito de la fecundación y posterior desarrollo del fruto, la temperatura tiene una importancia crucial. Aunque la cantidad de granos de polen viables producidos por cada flor depende del cultivar, temperaturas extremas afectan a la meiosis de las células madres del polen y a la formación de las tétradas. Esto impide la formación normal del grano de polen y reduce mucho la cantidad de polen viable, por lo que afecta al cuajado del fruto reduciendo mucho la productividad de las plantas (Karapanos *et al*, 2008). Las bajas temperaturas (<7°C) afectan al desarrollo de la microspora en dos estadios, 11 y 5 días antes de la antesis. De manera que cuando las plantas se cultivan a 18°C día/7°C noche, hasta transcurridos 14 días en condiciones de temperatura óptimas no se recupera la fertilidad del polen. Las altas temperaturas también impiden la formación de polen viable. En este caso temperaturas superiores a 32°C impiden la

formación del grano de polen y el estadio más sensible se da a 8 días antes de la antesis. El desarrollo del gametofito femenino no es tan sensible a las diferencias de temperatura. A temperaturas nocturnas de 7°C la macrosporogénesis se da con normalidad y a temperaturas diurnas de 33°C también, aunque temperaturas extremas superiores a 40°C si impiden el desarrollo normal de la macrospora. Combinaciones de temperaturas diurnas menores de 28°C y nocturnas mayores de 23°C también dificultan el desarrollo normal, probablemente debido a desequilibrios hormonales (Karapanos *et al*, 2008).

### 3. Cuajado y desarrollo del fruto

El fruto está constituido por el ovario maduro y en ocasiones por otras partes de la flor. Tras la polinización y fertilización de los óvulos, el ovario se diferencia para dar lugar al fruto, proporcionando un ambiente adecuado para la maduración de las semillas y su dispersión. Dentro de las angiospermas encontramos una gran variedad de frutos (Figura 4), que van desde los pequeños frutos tipo aquenio, que contienen una única semilla, hasta los enormes frutos tipo pepónide de las cucurbitáceas (Roth, 1977).

Los frutos se clasifican atendiendo a su consistencia en secos o carnosos. Los frutos secos a su vez pueden ser dehiscentes, cuando están constituidos por una vaina que tras secarse se abre, o no dehiscentes. Para el estudio de este tipo de frutos la especie modelo empleada es *Arabidopsis*, cuyo fruto está constituido por una silicua que se abre por dehiscencia liberando las semillas. Los frutos carnosos también se dividen en climatéricos, cuyo proceso de maduración está inducido por un aumento en la producción de etileno, y no climatéricos. Como especie modelo del desarrollo de frutos carnosos se emplea el tomate, esta especie es la más empleada en estudios de maduración debido en gran medida a su importancia económica. Además durante mucho tiempo se han llevado a cabo programas de mejora, con lo que hoy en día se dispone de un gran número de mutantes y variedades que afectan a distintos aspectos del desarrollo y maduración del fruto.



**Figura 4.** Tipos de frutos.

### 3.1 Fases del desarrollo del fruto

A pesar de las grandes diferencias en el aspecto de los diversos frutos, de manera general su desarrollo se puede dividir en cuatro fases (Gillaspy *et al*, 1993). La primera fase comprende el desarrollo hasta la antesis y el cuajado del fruto, durante la segunda fase se produce un crecimiento del fruto debido sobre todo a la división celular, y en la tercera fase el crecimiento del fruto continua por expansión celular hasta alcanzar el tamaño de fruto maduro. A estas tres fases les sigue la cuarta fase de maduración y senescencia.

El descubrimiento de los mecanismos y genes implicados en el desarrollo del fruto se ha llevado a cabo principalmente empleando *Arabidopsis* como modelo. El estudio de mutaciones que afectan al desarrollo del carpelo y del fruto ha llevado al descubrimiento de genes como

*ERECTA* (*ER*), que controla la forma del fruto (Torii *et al*, 1996) o *FRUITFULL*, un gen MADS-box que impide la elongación y diferenciación de diversos tipos celulares (Gu *et al*, 1998). Durante los últimos años con el desarrollo de los microarrays de ADN ha sido posible avanzar más en el estudio global del transcriptoma. Esto ha permitido descubrir la expresión de más de 1100 factores de transcripción durante el desarrollo del fruto (de Folter *et al*, 2004).

De igual manera que *Arabidopsis* ha constituido la planta modelo para las primeras fases de desarrollo del fruto y para la maduración de frutos secos dehiscentes, el tomate es el modelo para la maduración de frutos carnosos climatéricos. En esta especie, los esfuerzos se han centrado principalmente en descubrir los mecanismos implicados en el proceso de maduración. Para ello han sido muy útiles los mutantes relacionados con la señalización de etileno, en los que se producen alteraciones en el proceso de maduración (Moore *et al*, 2002).

### 3.2 Desarrollo del fruto en tomate

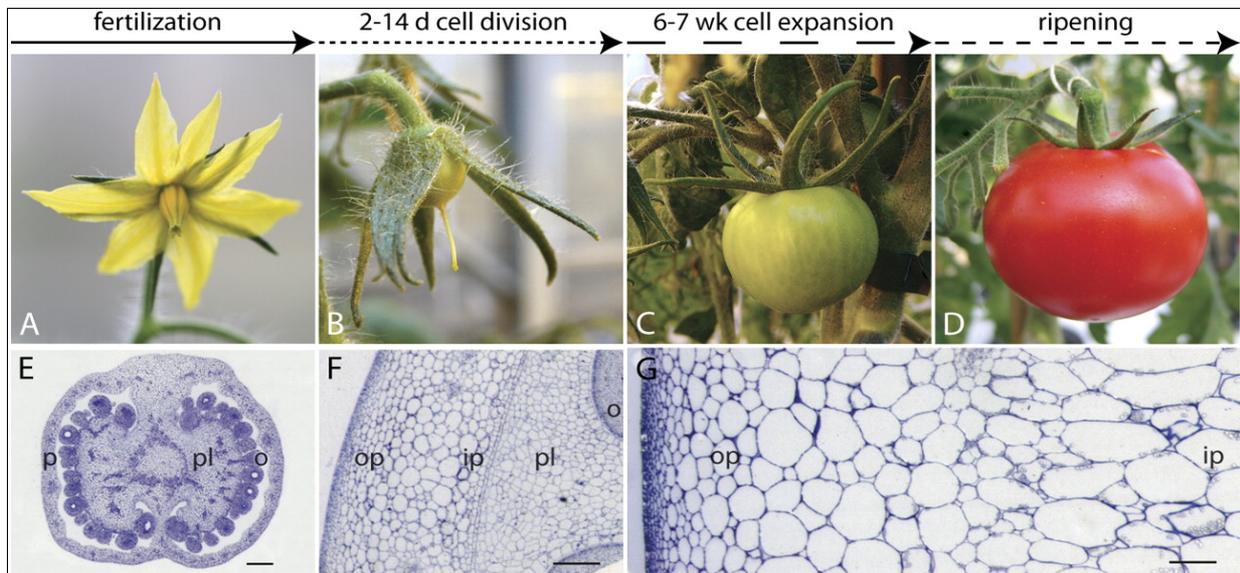
El fruto del tomate está constituido por una baya con un grueso pericarpio carnoso que contiene multitud de semillas. El gineceo, y por tanto el fruto, está compuesto normalmente por dos o tres carpelos. Sin embargo, existe una gran variabilidad dentro de esta especie y en algunas variedades que presentan frutos de mayor tamaño los frutos pueden estar constituidos por hasta diez carpelos.



**Figura 5.** Variabilidad de frutos de tomate.

## Introducción

En tomate el desarrollo del fruto comienza con la fertilización, aproximadamente dos días después de la polinización. En esta especie el desarrollo del fruto se divide en tres fases (Gillaspy *et al*, 1993), más una cuarta de maduración y senescencia (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema del proceso de desarrollo del fruto en tomate. **A, E.** ovario en antesis. **B, F.** Fruto a 10 DPA. **C, G.** Fruto 5 semanas tras la polinización. **D.** fruto maduro. P, pericarpio; op mesocarpo; ip, endocarpo; pl, placenta; o, óvulo. Barra de escala 200µm (de Jong *et al*, 2009a).

Con la fertilización de los óvulos se produce el cuajado del fruto, que se caracteriza por la reanudación de la división celular tras la parada en el crecimiento que tiene lugar en el carpelo durante la antesis. Después de la fase de cuajado tiene lugar una fase de división celular que continua durante diez días (Gillaspy *et al*, 1993). Durante esta fase también comienza el desarrollo del embrión, teniendo lugar las primeras divisiones aproximadamente a 5 días post antesis (DPA) (Smith, 1935). En esta fase la tasa de división celular está controlada por el número de óvulos fertilizados (Varga y Bruinsma, 1986), por lo que el tamaño y peso del fruto maduro están influenciados por el número de semillas (Nitsch, 1970). El crecimiento durante la tercera fase de desarrollo se debe principalmente a la expansión celular, que continua durante aproximadamente cuatro semanas hasta que el fruto alcanza su tamaño final. Durante esta fase también continua el desarrollo del embrión, a un ritmo más lento que en *Arabidopsis*, alcanzando el estadio de torpedo aproximadamente a 16 DPA (Smith, 1935).

Una vez finalizado el desarrollo, tiene lugar la fase de maduración y senescencia que al tratarse de un fruto climatérico está regulada por etileno. A diferencia de *Arabidopsis*, el tomate posee un fruto carnoso, por lo que a lo largo de esta última etapa del desarrollo se producen un gran número de cambios en el fruto. Como alteraciones en la pigmentación, la textura y el contenido de metabolitos del fruto, además de aumentar la susceptibilidad a los ataques producidos por patógenos (Giovannoni, 2004).

La mayoría de estudios del desarrollo del fruto de tomate se centran en los procesos que tienen lugar durante la maduración (Giovannoni, 2004), ya que es el estadio donde se producen la gran mayoría de cambios metabólicos que determinarán la cantidad final de metabolitos del fruto y sus condiciones nutraceuticas. Además, el conocimiento del proceso de maduración y senescencia ha permitido aislar genes implicados y desarrollar variedades donde el retraso en estos procesos facilita la manipulación del producto a nivel industrial. Sin embargo, algunos estudios más recientes que comprenden fases más tempranas del desarrollo han puesto de manifiesto la importancia del desarrollo previo del fruto para determinar la calidad final (Lemarie-Chamley *et al*, 2005; Faurobert *et al*, 2007 y Mounet *et al*, 2009). Aunque sólo muy recientemente se han publicado estudios relacionados con el cuajado del fruto, a pesar de la gran importancia que tiene este proceso (Pascual *et al* 2007; Vriezen *et al* 2008; Pascual *et al* 2009 y Wang *et al*, 2009).

### 3.3 Cuajado del fruto en tomate

Una vez la flor se desarrolla hasta llegar a la antesis se reduce el ritmo de las divisiones celulares. Al llegar a este punto la flor puede seguir dos caminos, senescencia y aborto de la flor, o cuajado y desarrollo del fruto. La elección de un camino u otro depende del éxito de la polinización, germinación del grano de polen, fecundación y de la competencia con otros frutos que puedan estar desarrollándose. Este proceso está regulado por señales hormonales, en la antesis el nivel de hormonas en el ovario es mínimo y cuando tienen lugar la polinización y fertilización se genera una cascada de señales que inducen el cuajado del fruto (revisado por Ozga y Reinecke, 2003).

## *Introducción*

### *Polinización y germinación del grano de polen*

El tomate es una planta típicamente autógena, en la mayoría de las variedades el estigma se encuentra inserto en el cono estaminal, de manera que será polinizado por polen procedente de la propia flor. Sin embargo, existen algunas variedades con estilos exsertos en las que si se puede dar cierto porcentaje de polinización cruzada. Además las condiciones ambientales también afectan a la longitud del estilo, lo que afecta a su vez el grado de autogamia (Chamarro, 1995). Los estigmas son receptivos al polen desde dos días antes de la antesis y seguirán receptivos durante cuatro o ocho días más. Durante este periodo se produce la antesis, las flores se abren y se da la dehiscencia de las anteras permitiendo la caída de los granos de polen en el estigma (Smith, 1935). Las condiciones ambientales tienen gran influencia en este proceso. La humedad relativa juega un papel muy importante, debe situarse alrededor del 70% para que la polinización sea óptima. Humedades superiores dificultan la liberación de los granos de polen de las anteras y el ambiente seco impide la adhesión de los granos a la superficie del estigma (Picken, 1984). Una vez el polen se encuentra en el estigma se produce la germinación. El polen permanece inactivo durante un número variable de horas, dependiendo de la temperatura. El tiempo varía entre media hora a 37°C y 20h a 5°C, fuera de este rango la germinación se reduce drásticamente.

### *Crecimiento del tubo polínico y fecundación*

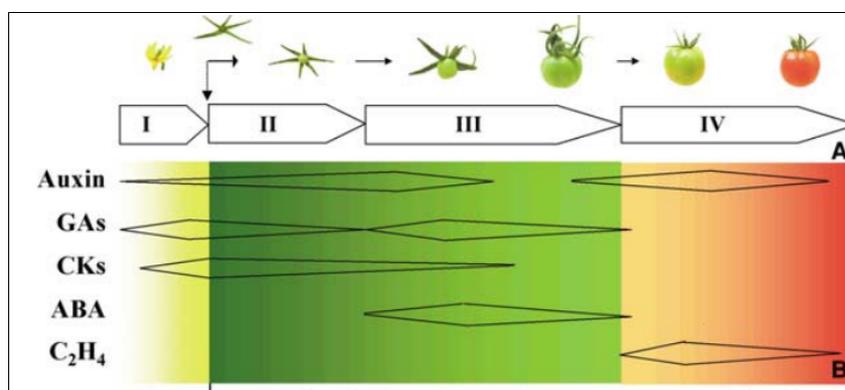
Tras la germinación del grano de polen el tubo polínico comienza su crecimiento a lo largo del estilo. La velocidad de progresión del tubo depende de la temperatura, dentro del rango 10°C-35°C la velocidad de crecimiento aumenta con la temperatura. A temperaturas menores de 10°C el crecimiento es muy lento y no se llega a producir la fecundación, cuando la temperatura es superior a 35°C se inhibe el crecimiento. Durante el crecimiento a lo largo del estilo tiene lugar la división de la célula generativa y se generan los dos microgametos. El tubo polínico sigue su desarrollo hasta llegar al ovario y penetra dentro de los óvulos para llegar al saco embrionario, momento en el cual se produce la fecundación. En condiciones de buena radiación y temperatura alrededor de 20°C, transcurren entre 18 y 30 horas desde la polinización hasta que tiene lugar la fecundación. En estas condiciones, tras 96 horas ya se observa el endospermo conformado por 8 células y ha tenido lugar la primera división del embrión (Picken, 1984).

### Iniciación del fruto

En condiciones idóneas la iniciación del fruto tiene lugar tras la fecundación. Tanto el grano de polen al germinar, como el embrión y posteriormente la semillas generan estímulos positivos de crecimiento que inducen la reanudación del desarrollo del carpelo. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales son adversas (altas temperaturas, iluminación insuficiente, etc) las flores pueden caer incluso después de la fertilización. El fallo en el cuajado también puede estar inducido por la competencia entre frutos por los mismos metabolitos. Este fenómeno se da tanto entre frutos dentro del mismo ramillete como entre ramilletes. En una misma inflorescencia los últimos frutos tienen menor tamaño que los primeros. Dentro de plantas, cuando la carga de fruto es grande, en ocasiones todos los frutos de una misma inflorescencia muestran un retraso en el crecimiento (Heuvelink, 2005).

#### 3.3.1 Papel de las hormonas en el cuajado y desarrollo del fruto en tomate

El desarrollo del fruto en tomate implica la regulación conjunta de diversos procesos: división, elongación y diferenciación celular. Las hormonas vegetales están implicadas en la coordinación de todos estos procesos (Figura 7). Las auxinas, giberelinas (GAs), etileno ( $C_2H_4$ ), ácido abscísico (ABA) y citoquininas (CKs) están implicadas en diversas fases del desarrollo del fruto (revisado por Gillaspay *et al*, 1993). Además también intervienen otros reguladores como poliaminas, brasinoesteroides y ácido jasmónico.



**Figura 7.** Regulación hormonal durante el desarrollo del fruto en tomate. **A.** fases del desarrollo. **B.** flujo de las distintas hormonas (Srivastava y Handa, 2005).

### Auxinas

Las auxinas están implicadas en un gran número de procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas. A nivel celular, las auxinas promueven la división, extensión y diferenciación celular. A nivel molecular, las auxinas son capaces de alterar completamente el transcriptoma tan solo unos pocos minutos después de su aplicación (Teale *et al*, 2006). La respuesta a auxinas está mediada por diversas familias génicas (Hagen *et al*, 2004). Los más conocidos son los genes tipo Aux/IAA y los ARF (Auxin Response Factors). Los genes Aux/IAA se localizan en el núcleo de la célula y se caracterizan porque su nivel de expresión aumenta muy rápidamente en respuesta al tratamiento con auxinas. Estas proteínas parecen ser represores de la transcripción regulada por auxinas, a pesar de que carecen de dominios de unión al ADN. Probablemente su acción se dé por medio de la unión a ARF, que sí son factores de transcripción. Los ARFs contienen un dominio de unión al ADN tipo amino-terminal B3 y dominios C-terminales de unión a otras proteínas ARF o Aux/IAA. Estos genes regulan procesos de desarrollo dependientes de la acción de auxinas y pueden ser tanto represores como activadores de la transcripción.

El papel de las auxinas en el desarrollo del fruto se conoce desde hace más de 60 años. Gustafson (1936) demostró que la aplicación de sustancias tipo auxina en los estigmas de tomate promovía el desarrollo del fruto incluso en ausencia de fecundación y polinización, dando lugar a frutos sin semillas (partenocárpicos). Sin embargo, los frutos inducidos por auxinas se desarrollan de manera diferente a los frutos obtenidos tras la polinización y fecundación. En el desarrollo normal, el periodo de división celular comprende 10 a 14 días después de la antesis (Gillaspy *et al*, 1993). En los frutos inducidos por la aplicación de auxinas, este periodo es algo más corto, comprende únicamente 10 días, pero la tasa de división celular es mayor, dando lugar a un incremento mayor del pericarpio. Por lo tanto, al finalizar el desarrollo se obtiene un fruto de aproximadamente el mismo tamaño que el fruto normal pero con mayor número de células (Serrani *et al*, 2007).

A lo largo del desarrollo del fruto las auxinas presentan dos picos de concentración, uno a 8 DPA, durante la iniciación de la expansión celular, y otro 30 días después de la antesis, durante el desarrollo final del embrión (Srivastava y Handa, 2005). Al principio del desarrollo, las

auxinas se producen en la zona central del fruto, ya sea en los óvulos en desarrollo o en los tejidos que los rodean. La hormona es transportada a las capas exteriores dando lugar a un gradiente de concentración en los diversos tejidos del fruto, que media las respuestas a la hormona como división y expansión celular e interacción con otras hormonas (Lemaire-Chamley *et al*, 2005). El segundo pico de concentración de auxinas no se da durante el desarrollo de los frutos partenocárpicos (Mapelli *et al*, 1978), lo que sugiere que durante el final del desarrollo la producción de auxinas depende de las semillas en desarrollo.

### *Giberelinas*

Las giberelinas (GAs) controlan diversos procesos de desarrollo, como la germinación, elongación del tallo, floración y cuajado del fruto. La síntesis de estas hormonas está regulada mediante un mecanismo de auto-inhibición. La presencia de GAs activas reprime la expresión de las enzimas giberelina 20 oxidasas y giberelina 3 oxidasas, implicadas en la síntesis de giberelinas, y promueve la expresión de la giberelina 2 oxidasa que degrada las hormonas (Hedden y Phillips, 2000). A nivel molecular se desconoce el mecanismo exacto de acción de las giberelinas. Weiss y Ori (2007) sugieren que la ausencia de genes diana específicos de GAs se debe a que esta hormona actúa principalmente mediante la interacción con otras fitohormonas.

Las giberelinas juegan un papel crucial en el desarrollo y cuajado del fruto. La expresión de las GAs20 oxidasas, enzimas clave de la regulación de la concentración de GAs activas, está regulada a lo largo del desarrollo de la flor y del cuajado en tomate (Rebers *et al*, 1999), mostrando un aumento tras la antesis. Además, la aplicación de GAs en el carpelo induce el desarrollo partenocárpico del fruto (Wittwer *et al*, 1957) y las variedades de tomate partenocárpicas facultativas presentan un aumento de la concentración de GAs en el carpelo durante la antesis (Fos *et al*, 2000, 2001 y Olimpieri *et al*, 2007). Sin embargo, al igual que ocurre con los frutos obtenidos mediante la aplicación de auxinas, los frutos inducidos por la aplicación de GAs son diferentes a los frutos con semillas. Tienen menor tamaño y un menor número de capas celulares en el pericarpio, pero un mayor volumen celular y malformaciones en las cavidades locales (de Jong *et al*, 2009a). También existen diferencias en el transcriptoma de los frutos inducidos por GAs. Los genes implicados en la respuesta a auxinas se activan en

## *Introducción*

respuesta a la polinización, pero no en respuesta al tratamiento con GAs. Esto parece indicar que la polinización promueve un aumento de auxinas y éstas inducen la expresión de GAs (Vriezen *et al*, 2008).

## *Citoquininas*

Las citoquininas (CKs) se caracterizan por promover la división celular en plantas. En el fruto de tomate la mayor concentración de CKs se encuentra en la semilla entre 5 días después de la antesis y decrece hasta el comienzo de la maduración (Srivastava y Handa, 2005). Durante el desarrollo de frutos partenocárpicos se ha observado que la concentración de CKs es menor pero no decrece al llegar al estadio de maduración (Mapelli, 1981). Durante el desarrollo normal, las CKs serían transportadas a la semilla, induciendo la síntesis de algún compuesto que promovería la división celular en los tejidos circundantes. Esto explicaría porque el nivel de CKs es menor en los frutos partenocárpicos, ya que estos carecen de semillas (Gillaspy *et al*, 1993).

## *Etileno*

El etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) es la hormona vegetal más estudiada, juega un papel importantísimo en el proceso de senescencia de diversos órganos de la planta y en la maduración del fruto. La síntesis de etileno está controlada por dos sistemas. El sistema 1, que es responsable de la producción basal de etileno, es un sistema auto-inhibitorio. El sistema 2 es un sistema auto-catalítico y regula la producción de etileno durante la maduración del fruto y la senescencia entre otros procesos. La señal de etileno es percibida por los receptores ETR (Klee y Clark, 2004). En tomate existen 6 receptores de etileno LeETRs. Estos receptores poseen dominios de unión a etileno y dominios kinasa que median en la transducción de la señal. En ausencia de etileno estos receptores actuarían como reguladores negativos, suprimiendo la expresión de los genes inducidos por etileno.

Durante el desarrollo del fruto del tomate la producción de etileno presenta dos picos. Un día después de la polinización se produce un aumento de la síntesis de etileno, que induce la senescencia de los pétalos (Llop-Tous *et al*, 2000), posteriormente la hormona se mantiene en

un nivel basal. Cuando comienza la maduración del fruto se produce un segundo pico de producción de etileno, que es el responsable de los cambios de color y composición del fruto que tienen lugar durante la maduración (Giovannoni, 2004).

#### *Ácido abscísico*

El ácido abscísico está implicado en las respuestas de la planta a diversos tipos de estreses y juega un papel importante en el desarrollo, maduración e inhibición de la germinación de las semillas. Su papel durante el desarrollo del fruto está ligado al desarrollo de las semillas. La concentración del ABA en el fruto comienza a aumentar una o dos semanas después de la antesis y se mantiene alta durante todo el proceso de desarrollo de la semilla hasta el comienzo de la maduración del fruto.

#### *Otros reguladores*

Existen otros reguladores vegetales implicados en el desarrollo del fruto: poliaminas, brasinoesteroides y ácido jasmónico. La aplicación de diversas poliaminas en el ovario de tomate produce desarrollo del fruto (Fos *et al*, 2003), lo que demuestra la implicación de estos reguladores en el cuajado. La concentración de poliaminas en el ovario aumenta tras la polinización o el tratamiento con auxinas, posteriormente el nivel de estas sustancias desciende al terminar la fase de división celular (Alabadi *et al*, 1996). Los brasinoesteroides están implicados en la regulación de la maduración del fruto y en la composición final del mismo (Srivastava y Handa, 2005). El ácido jasmónico también está implicado en la maduración del fruto, la concentración de esta hormona aumenta durante el proceso de maduración y su aplicación induce la síntesis de etileno y el viraje de color en el fruto (Imanishi y Nagata, 2003).

#### *3.3.2 Caracterización de genes implicados en el cuajado del fruto en tomate*

A pesar de la importancia del cuajado para el desarrollo posterior del fruto, la mayoría de los estudios realizados en tomate se centran en el aislamiento y caracterización de genes implicados en el proceso de maduración del fruto (Moore *et al*, 2002). Sin embargo, durante el

## Introducción

desarrollo de esta tesis, el estudio de diversos genes capaces de inducir el desarrollo del fruto en ausencia de fecundación ha permitido avanzar en el conocimiento del control de este proceso.

### *Genes implicados en la regulación hormonal*

Los genes más estudiados han sido los relacionados con la respuesta a auxinas. Se han encontrado diversos genes implicados en la señalización de auxinas relacionados con el cuajado. Algunos, como el gen *diageotropica* (*dgt*), parecen ser necesarios para el cuajado del fruto y otros, como IAA9, IAA8 y ARF7, parecen inhibir el crecimiento del ovario.

Balbi y Lomax (2003) descubrieron la implicación del gen *Diageotropica* (*dgt*) en el cuajado del fruto. La mutación de este gen provoca el fenotipo característico de los mutantes resistentes a auxinas, con numerosos efectos en el desarrollo vegetativo de la planta, como reducción de la longitud de los internodos y ausencia de raíces laterales. También produce alteraciones en el desarrollo reproductivo como: retraso en la floración, reducción del cuajado del fruto, aumento del tiempo desde la antesis hasta la maduración, reducción del tamaño del fruto, número de lóculos y semillas. A nivel molecular, la ausencia de este gen produce la sobreexpresión de los genes IAA2 y IAA8, así como la alteración de la expresión de diversos genes relacionados con la síntesis de etileno. Aunque se desconoce el mecanismo exacto, el gen *dgt* parece ser necesario para el correcto cuajado del fruto, actuando junto a diversos genes de respuesta a auxinas.

Wang y colaboradores (2005) caracterizaron el gen *IAA9* perteneciente a la familia de genes *Aux/IAA*, implicados en la respuesta a auxinas. El silenciamiento de este gen produce plantas hipersensibles al tratamiento con auxinas, con hojas simples en lugar de compuestas y capaces de producir frutos partenocárpicos. *IAA9* parece actuar como un represor transcripcional de la señalización de auxinas impidiendo el cuajado del fruto.

Goetz y colaboradores (2007) transformaron tomate con una construcción capaz de silenciar el gen *ARF8* y obtuvieron plantas capaces de desarrollar frutos partenocárpicos. Los mutantes de este gen en *Arabidopsis* también son capaces de desarrollar frutos partenocárpicos,

lo que indica que ARF8 actúa como un inhibidor del cuajado del fruto en ambas especies.

De Jong y colaboradores (2009b) caracterizaron el gen de tomate homólogo al *ARF7* de *Arabidopsis* perteneciente a la familia de los Auxin Response Factors. La expresión de este gen es elevada durante el desarrollo floral y desciende drásticamente 48 horas después de la polinización, cuando tiene lugar el cuajado del fruto. El silenciamiento de *ARF7* induce el cuajado partenocárpico. Esto sugiere que *ARF7* funciona como un inhibidor del cuajado del fruto hasta que tiene lugar la polinización.

Como era de esperar, los genes relacionados con la respuesta a GAs también están implicados en el cuajado del fruto. Marti y colaboradores (2007) analizaron la función de las proteínas DELLA, represores de la señal de GAs en tomate. En esta especie, a diferencia de *Arabidopsis* donde existe una familia de al menos 5 proteínas DELLA, parece haber un único gen *DELLA*, cuyo silenciamiento produce desarrollo partenocárpico del fruto. Los frutos obtenidos presentan malformaciones en los lóculos, parecidas a las de los frutos inducidos por GAs. El gen *DELLA* en tomate actuaría como un represor del desarrollo del fruto y estaría negativamente regulado por la acción de GAs.

#### *Factores de transcripción tipo MADS Box implicados en el cuajado.*

La formación de los diferentes verticilos de la flor está controlada por la acción de factores de transcripción. Estudios recientes han demostrado que la acción de estos factores va más allá del control de la formación de la flor y está relacionado con el cuajado del fruto.

Los genes *TM5* y *TM29* de tomate son factores de transcripción implicados en la determinación del meristemo floral y en la diferenciación de los pétalos, anteras y estambres (Pnueli *et al*, 1994b y Ampoach-Dwamena *et al*, 2002). De manera que cuando se silencia la expresión de alguno de los genes se producen alteraciones en los últimos tres verticilos que presentan características petaloides. Además de las alteraciones en la flor, en ausencia de ambos genes las plantas son capaces de desarrollar frutos partenocárpicos. Estos genes parecen controlar la diferenciación floral y limitar el desarrollo del fruto en espera de la polinización.

### 3.3.3 Influencia ambiental en el cuajado del fruto en tomate, problemas y soluciones

Las condiciones ambientales tiene un gran impacto en el cuajado del tomate. Las condiciones ideales son temperaturas día/noche de 25°C/18°C, alta luminosidad y humedad relativa alrededor del 60-80%. Cuando nos alejamos de las condiciones óptimas el cuajado se reduce, disminuyendo en algunos casos drásticamente la productividad de las plantas.

El factor más determinante para este proceso es la temperatura. Cuando el cultivo se realiza en temperaturas muy altas se ven afectadas la meiosis en los gametofitos, la posición del estigma, el desarrollo de las anteras, la receptividad del estigma al polen, la germinación del grano de polen, el crecimiento del tubo polínico, la viabilidad del óvulo y los procesos de post-fertilización. De manera que a medida que incrementamos la temperatura el cuajado del fruto disminuye y a partir de temperaturas de 37°C cesa la producción (Peet *et al*, 1998). Las bajas temperaturas también impiden el cuajado, en este caso el efecto se debe sobre todo a problemas en el gametofito masculino, problemas en la microsporogénesis, germinación del grano de polen, progresión del tubo polínico, etc. Además las bajas temperaturas provocan alteraciones en la morfología de la flor (Lozano *et al*, 1998). Junto a la temperatura, la humedad y la luminosidad también influyen en el cuajado. Humedades relativas muy altas dificultan la liberación del grano de polen, mientras que ambientes muy secos impiden la germinación del grano de polen en el estigma. En cuanto a la luminosidad, en condiciones de baja luminosidad descende la cantidad de foto-asimilados, produciéndose deficiencias en el desarrollo de las anteras y reducción de la viabilidad del polen (Karapanos *et al*, 2008).

Las condiciones ambientales pueden ser controladas mediante el cultivo en invernaderos con sistemas de calefacción, refrigeración y lámparas para regular el fotoperiodo. Sin embargo la utilización de esta tecnología supone un coste adicional, especialmente cuando se cultiva fuera de temporada en zonas como el norte de Europa, donde la temperatura y luminosidad son bajas, y en lugares del sur de Europa, donde durante el verano las temperaturas diurnas superan los 40°C. Por ello, es muy aconsejable mejorar el porcentaje de cuajado en condiciones subóptimas y aumentar el rango de condiciones en que las plantas son capaces de cuajar. De esta manera se consigue aumentar la producción y cultivar fuera del ciclo habitual, sin necesidad de coste

adicional, ni grandes infraestructuras. Para conseguir mejorar el cuajado se emplean tres estrategias: mejora de la polinización, uso de fitorreguladores y empleo de variedades capaces de cuajar en condiciones adversas.

La polinización se puede incrementar mediante la introducción de insectos polinizadores como *Bombus terrestris* (L.) o mediante el empleo de vibradores. Si las plantas producen polen viable pero no en grandes cantidades, el empleo de estas técnicas mejora significativamente el cuajado. Sin embargo, en ausencia de polen viable el empleo de polinizadores no consigue mejorar el cuajado (Pressman *et al*, 1999). En este caso es necesario el empleo de métodos alternativos. En condiciones de baja fertilidad se pueden aplicar fitorreguladores. Cuando la temperatura impide el desarrollo normal del polen, la aplicación de auxinas y giberelinas promueve el desarrollo del fruto en ausencia de fecundación, dando lugar al cuajado de frutos sin semillas. Sin embargo, estas técnicas dan como resultado frutos de baja calidad, con tamaño reducido o malformaciones (Sasaki *et al*, 2005). Otra opción es emplear variedades capaces de cuajar en condiciones subóptimas. Se pueden emplear variedades que producen polen viable en condiciones de bajas temperaturas, variedades tolerantes a estrés térmico o variedades partenocárpicas. Las variedades partenocárpicas son aquellas en las que el cuajado y desarrollo del fruto es independiente de la polinización y fecundación, de manera que el cuajado se da incluso en condiciones de baja fertilidad del polen.

#### **4. Desarrollo del fruto en ausencia de fecundación**

El desarrollo normal del fruto tiene lugar tras la polinización y fecundación. Sin embargo, mediante los fenómenos de apomixis y partenocarpia se produce el desarrollo del fruto sin necesidad de fecundación. El estudio de estos procesos es muy interesante puesto que puede ayudar a comprender mejor los mecanismos implicados en el cuajado del fruto, además de proporcionar una buena herramienta para mejorar el cuajado en condiciones que impiden la polinización y/o fertilización.

### 4.1 Apomixis

La apomixis es la reproducción asexual o clonal de una planta por medio de semillas (Nogler, 1984). La apomixis puede ser facultativa, cuando la planta es capaz de desarrollar semillas procedentes de la ovocélula fecundada, u obligada, cuando la planta es estéril. Existen tres clases de apomixis atendiendo a la célula que da origen al nuevo embrión: diplosporia (la célula madre del saco embrionario o gametófito femenino se desarrolla directamente en un embrión) aposporia (el saco embrionario tiene su origen en una célula somática de las múltiples que rodean la célula madre del saco embrionario) y embriogenesis adventicia (no se desarrolla saco embrionario y el embrión se desarrolla a partir de células del esporofito diploide) (Savidan, 2000). Este carácter resulta muy interesante para la mejora de cultivos, ya que permite evitar todos los problemas de cuajado que derivan de una baja fertilidad del polen, además de servir para multiplicar y mantener genotipos híbridos. La apomixis no es muy común en la mayoría de especies cultivadas, ni en las especies modelo *Arabidopsis*, tomate y arroz. Por ello, para la mejora ha resultado mucho más interesante el uso de la partenocarpia.

### 4.2 Partenocarpia

En el desarrollo partenocárpico el fruto se desarrolla independientemente de la fecundación, dando lugar a un fruto sin semillas que carece de función biológica. La partenocarpia puede ser obligada, cuando el cultivar es estéril y únicamente puede producir frutos sin semillas, o facultativa, cuando es capaz de producir frutos con y sin semillas.

El estudio de este fenómeno es muy interesante desde el punto de vista básico para profundizar en los mecanismos moleculares que median en el cuajado del fruto, al separar este proceso del desarrollo del embrión. También presenta aplicaciones directas, puesto que la partenocarpia es un carácter que confiere muchas ventajas respecto al desarrollo normal de frutos con semillas. La ausencia de semillas mejora la calidad de los frutos a varios niveles (Varoquaux *et al*, 2000), por un lado es una ventaja clara para el consumidor cuando éstas son duras o con mal sabor, como ocurre con las uvas. Además es de esperar que en ausencia de semillas se retrase la senescencia del fruto puesto que ésta está inducida por las semillas en algunas especies, como

la sandía (Varoquaux *et al*, 2000). Por otro lado, en muchas especies vegetales como, tomate, berenjena y pimiento, la producción de polen viable está muy influenciada por las condiciones ambientales y la productividad desciende drásticamente al alejarnos del ideal de temperatura, humedad y luminosidad. Las plantas partenocárpicas, al ser capaces de desarrollar frutos sin semillas, pueden mantener la producción incluso durante los meses invernales (Karapanos *et al*, 2008). En el caso de la partenocarpia obligada, ésta presenta además ventajas de tipo comercial. Si todos los frutos carecen de semillas, se debe comprar la semilla todos los años a la casa comercial. Además, la ausencia de semillas hace posible el empleo de plantas transgénicas androestériles con la garantía de que no habrá diseminación de semillas.

A pesar de estas ventajas, la partenocarpia no se ha usado ampliamente en la agricultura. En algunos casos, las mutaciones que permiten el desarrollo partenocárpico tienen efectos pleiotrópicos que dan como resultado malformaciones en los frutos y baja calidad. En otras ocasiones, este carácter está controlado por sistemas multigénicos, lo que dificulta su introducción en otras variedades. Es necesario mejorar el conocimiento de este proceso y de los genes implicados en el mismo para su aplicación en la agricultura.

El tomate es la especie modelo para el estudio del desarrollo de los frutos carnosos. En esta especie existen diversos cultivares capaces de desarrollar frutos partenocárpicos además, se ha obtenido desarrollo partenocárpico del fruto artificialmente, mediante ingeniería genética y mediante aplicación de fitorreguladores (Gorguet *et al*, 2005). Por lo que esta especie es un sistema ideal para el estudio de la partenocarpia.

#### 4.3 Inducción de desarrollo partenocárpico en tomate

La partenocarpia es un carácter muy interesante desde el punto de vista aplicado puesto que ofrece la posibilidad de mejorar la calidad y producción de frutos en muchas de las especies cultivadas actualmente. Este carácter se encuentra de manera natural en algunas variedades de diversas especies, sin embargo también puede ser inducido artificialmente mediante la aplicación de hormonas implicadas en el cuajado o mediante ingeniería genética.

#### 4.3.1 Partenocarpia mediante aplicación de fitorreguladores

El cuajado del fruto está regulado por un delicado balance hormonal en el ovario. Durante la antesis el nivel de hormonas en el ovario es mínimo y únicamente tras la polinización y fecundación se produce un aumento de señales reguladoras que inducen el cuajado del fruto. Mediante la aplicación exógena de hormonas es posible superar el umbral de concentración hormonal necesario para la inducción del cuajado del fruto. La aplicación de citoquininas y poliaminas induce el cuajado partenocárpico (Malpelli, 1981; Fos *et al*, 2003), sin embargo han sido las auxinas y giberelinas las hormonas más empleadas. En agricultura se ha empleado la aplicación de auxinas sintéticas (4 clorofenoxiacético, ácido 2-hidroximetil-4-clorofenoxiacético, 3-indolbutírico, ácido naftalencético y ácido 2-4 diclorofenoxiacético) para conseguir producción del fruto a lo largo de todo el año (Chamarro, 1995). Estas sustancias, pulverizadas sobre las flores, inducen el cuajado y permiten la obtención de frutos en condiciones ambientales desfavorables para la polinización y fecundación. Sin embargo, el empleo de estas prácticas en la agricultura, a pesar de conseguir mejorar el cuajado en condiciones adversas, no está muy extendido. Probablemente porque la utilización de fitorreguladores supone un gasto adicional y los frutos obtenidos en muchos casos presentan tamaño menor y malformaciones, como escaso desarrollo de los lóculos y alteraciones en la pulpa (Serrani *et al*, 2007), que imposibilitan su comercialización.

#### 4.3.2 Partenocarpia mediante transgénesis

Tal y como se ha mencionado el desarrollo partenocárpico se puede inducir mediante la aplicación exógena de diversas fitohormonas, es por tanto posible inducir el desarrollo partenocárpico mediante la expresión en el ovario de genes implicados en la biosíntesis de hormonas vegetales. Se han registrado diversas patentes basadas en el empleo de construcciones que combinan genes de síntesis de auxinas, giberelinas y citoquininas bajo el control de promotores específicos del ovario (Spena y Rotino, 2001).

Una de las estrategias más empleadas es la partenocarpia inducida mediante la construcción *DefH9-iaaM* (Rotino *et al*, 1997). Esta construcción contiene un gen quimérico con

el promotor del gen *Deficiens Homologue 9 (DefH9)* de *Antirrhinum majus* (L.) y la secuencia del gen *iaaM* de *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi* (Van Hall) El gen *iaaM* codifica para una triptófano mono-oxigenasa que convierte el triptófano en indolacetamida. Esta sustancia no tiene actividad, pero es hidrolizada por las plantas para dar lugar al ácido indolacético (IAA), la auxina más común en plantas. En la construcción de Rotino y colaboradores (1997) este gen está fusionado con las secuencias reguladoras del *DefH9*, un factor de transcripción tipo MADS-box que se expresa específicamente en los óvulos, siendo su expresión en otros tejidos de la planta indetectable mediante análisis *northern blot*. Esta construcción produce un aumento de la concentración de auxinas en los óvulos, lo que induce el desarrollo de frutos partenocárpico en ausencia de fecundación, pero no impide el desarrollo de frutos con semillas cuando tiene lugar la polinización. Esta estrategia ha sido efectiva para la obtención de plantas partenocárpicas en tomate (Ficcadenti *et al*, 1999) y otras especies, como tabaco y berenjena (Rotino *et al*, 1997), fresa y frambuesa (Mezzetti *et al*, 2004), pepino (Yin *et al*, 2006) y vid (Constantini *et al*, 2007).

En tomate, la construcción DefH9-*iaaM* se ha empleado con éxito para inducir el desarrollo partenocárpico del fruto. Sin embargo, cuando se introduce esta construcción en determinadas variedades de tomate, los frutos desarrollados presentan malformaciones similares a las causadas por la aplicación de auxinas para inducir el cuajado (Pandolfini *et al*, 2002). Este problema se puede solucionar modificando la construcción, de manera que se reduzca la eficacia de la traducción del transgen. Esta nueva construcción DefH9-RI-*iaaM* se debe emplear en variedades especialmente sensibles a la acción de las auxinas para garantizar la obtención de frutos normales.

Aparte de las estrategias basadas en la alteración directa del metabolismo de las hormonas, la alteración de genes implicados en la respuesta a éstas también produce desarrollo partenocárpico del fruto. En tomate se han desarrollado plantas transgénicas que expresan el gen *rolB* en el ovario para inducir desarrollo partenocárpico (Carmi *et al*, 2003). El gen *rolB* de *Agrobacterium rhizogenes* (Conn) expresado de manera constitutiva induce en la planta síntomas característicos del tratamiento con auxinas. Sin embargo, cuando está bajo el control de las secuencias reguladoras de TPRP-F1 (tomato prolin rich protein), que se expresa durante las fases tempranas del desarrollo del fruto, las plantas transgénicas son capaces de desarrollar frutos

partenocárpico de tamaño y morfología comparables a los de las plantas control.

Roque (2004) plantea una estrategia totalmente diferente a estas dos, basadas en alteración del metabolismo o respuesta a hormonas, y obtiene desarrollo partenocárpico mediante la alteración del desarrollo de las anteras. Para ello, emplea la construcción END1::barnasa, compuesta por la región promotora del gen END1 de guisante, que se expresa en las anteras desde estadios muy tempranos, y el gen barnasa, un gen citotóxico. Las plantas transgénicas que portan esta construcción son antroestériles, ya que la acción del gen barnasa impide el desarrollo de la antera. Sin embargo, a pesar de la ausencia de polen funcional son capaces de producir frutos sin semillas. Esta estrategia presenta una ventaja respecto a las dos anteriores, no sólo se consigue desarrollo partenocárpico del fruto, sino que además se impide la diseminación del transgen al tratarse de plantas androestériles.

A pesar de los éxitos obtenidos mediante ingeniería genética para inducir el desarrollo partenocárpico de los frutos, estas estrategias presentan varios problemas. Por un lado, es necesario adecuar las construcciones empleadas al fondo genético de la variedad que se desea transformar para evitar la aparición de malformaciones en los frutos (Pandolfini, 2002). Por otra parte, la legislación vigente es muy restrictiva con el cultivo de organismos genéticamente modificados y existe un rechazo por parte del consumidor hacia este tipo de productos. Para evitar estos problemas una solución es el empleo de fuentes naturales de partenocarpia.

#### 4.4 Fuentes naturales de partenocarpia en tomate

En tomate existen diversas líneas con capacidad para desarrollar frutos partenocárpico. Destacan tres líneas por su capacidad de desarrollar frutos con prácticamente las mismas propiedades que los frutos polinizados: *Soressi* o *Montfavet 191* (Soressi y Salamini, 1975; Pecaut y Philouze, 1978), *Severianin* (Philouze y Maisonneuve, 1978) y RP75/59 (Reiman-Philipp, 1968). Estas líneas han sido las más estudiadas pero también existen otros genotipos con cierta tendencia a desarrollar frutos sin semillas como: PI 190256, Oregon Cherry, Oregon 11, Carobeta (Spena y Rotino, 2001) y las líneas de introgresión de *Solanum habrochaites* (S. Knapp y D.M. Spooner) IVT-line1 y IL5-1 (Gorguet *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de la existencia

de diferentes fuentes naturales de partenocarpia, aún no se ha conseguido aislar ninguno de los genes responsables de este fenotipo. En *Severianin* y RP75/59 existe controversia en cuanto al número de genes implicados en el control del carácter, y únicamente en ITV-line1, IL5-1 y Montfavet 191 se han localizado las regiones cromosómicas donde se encuentran los genes responsables de la partenocarpia.

#### 4.4.1 Partenocarpia en las líneas ITV-line 1 y IL5-1

Gorguet y colaboradores (2008) han estudiado la genética de las líneas de introgresión ITV-line 1 y IL5-1 con capacidad partenocárpica. Ambas líneas tienen capacidad para desarrollar frutos sin semillas de igual forma y color que los semillados y con los lóculos rellenos. La línea IL5 se desarrolló a partir de un cruce entre *S. habrochaites* (SH) y *S. lycopersicum* cv. *Moneymaker* (Finkers *et al*, 2007). Esta línea presenta capacidad partenocárpica y el estilo exerto desde el estadio de pre-antesis, lo que dificulta la fecundación y favorece la partenocarpia. Los autores identificaron 2 QTLs responsables del fenotipo partenocárpico en esta línea. Un QTL mayor, *pat4.1*, situado cerca del centrómero del cromosoma 4 y otro QTL en el cromosoma 5, *pat5.1*. El segundo QTL afectaría al nivel de partenocarpia, de manera que a mayor número de alelos procedentes de *S. habrochaites* la planta tendría mayor capacidad partenocárpica, siempre y cuando tenga al menos un alelo de *S. habrochaites* para el QTL *pat4.1*.

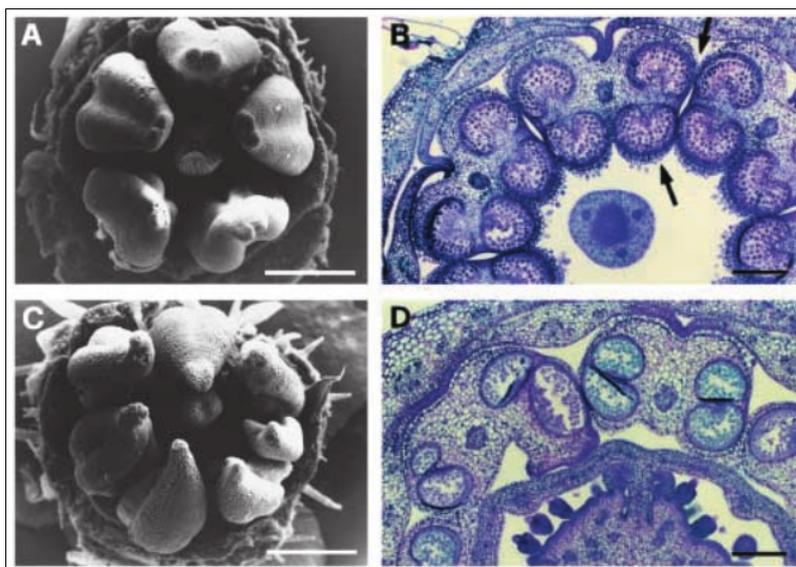
La línea ITV-line1 se desarrolló en los 80s a partir de un cruce interespecífico entre *S. habrochaites* y *S. lycopersicum* (Zijlstra, 1985). Esta línea posee al menos 5 fragmentos de *S. habrochaites* en los cromosomas 4, 5, 6, 9 y 11. La partenocarpia en esta línea está controlada por, al menos, dos QTLs con igual peso, uno situado cerca del centrómero del cromosoma 4, *pat4.2*, y otro cerca del telómero del brazo largo del cromosoma 9, *pat9.1*. En este caso, es necesaria la presencia de un alelo de *S. habrochaites* en ambos QTLs para obtener desarrollo partenocárpico. En ambas líneas se mapearon QTLs cerca del centrómero del cromosoma 4, aunque se desconoce si *pat4.1* y *pat4.2* son el mismo gen. Al comparar los marcadores COS (Conserved Orthologue Genes, secuencias presentes una única vez en el genoma de tomate y *Arabidopsis*) de esta zona del cromosoma 4, se descubrió que éstos estaban situados en el cromosoma 5 de *Arabidopsis* muy cercanos al gen *ARF8*, cuyo silenciamiento induce el

desarrollo partenocárpico del fruto. Es probable que el ortólogo al gen *ARF8* de *Arabidopsis* sea el responsable del fenotipo partenocárpico en ambas líneas de tomate.

### 4.4.2 Partenocarpia en *Soressi* o *Montfavert 191*

La partenocarpia debida al gen *pat* fue descrita por primera vez en 1975 por Soressi y Salamini. Los autores describieron el mutante short anther (*sha*, anteras cortas) en una población obtenida mediante mutagénesis con ethyl methanosulfonato (EMS). El mutante *sha* se caracterizaba por un desarrollo anormal de las anteras, además, presentaba la capacidad de desarrollar frutos en ausencia de fecundación. En principio, este fenotipo se achacó a dos genes recesivos *sha* y *pat* (frutos partenocárpicos). Posteriormente, Pecaute y Philouze (1978) obtuvieron un mutante espontáneo con el mismo fenotipo al que denominaron *Montfavert 191*. Estos autores comprobaron que ambos mutantes eran alélicos y que era imposible obtener plantas con únicamente uno de los caracteres. Por ello concluyeron que ambos caracteres estaban causados por una mutación recesiva en un único gen denominado *pat* con efectos pleiotrópicos (Philouze y Pecaute, 1986).

El fenotipo *pat* se caracteriza por producir un alto número de frutos sin semillas, de aproximadamente 2/3 del tamaño normal, y por tener fertilidad reducida; solo en contadas ocasiones produce frutos con un número bajo de semillas. Esto es debido a los efectos pleiotrópicos de la mutación, que produce alteraciones en el tercer y cuarto verticilo de la flor (Figura 8) (Mazzucato *et al* 1998). Los estambres tienen un tamaño mucho menor y en ocasiones presentan estructuras carpeloides y óvulos, por lo cual la producción de polen viable está muy reducida. También presenta alteraciones en el desarrollo de los óvulos, debidas al desarrollo inadecuado de la cubierta, con lo que se reduce la producción de gametofitos femeninos viables. Además, parece haber alteraciones durante el crecimiento del tubo polínico de manera que la microspora no es capaz de llegar hasta los óvulos (Mazzucato *et al* 2003). Estas alteraciones son más o menos severas dependiendo de las condiciones ambientales. Las bajas temperaturas nocturnas favorecen la aparición de las alteraciones, y también influye la posición de la flor en la planta, los ramilletes superiores presentan menor porcentaje de flores con alteraciones (Mazzucato *et al*, 1999).



**Figura 8.** A y B Androceo de plantas control. C y D androceo de plantas *pat*. Barra de escala 200 $\mu$ m (Mazzucato *et al* 1998).

El fenotipo *pat* parece estar mediado por la alteración en la expresión de diversos genes (Olimpieri *et al*, 2007). Por un lado, la GA20 oxidasa 1, implicada en la síntesis de GAs activas, está expresada constitutivamente en el mutante, mientras que durante el desarrollo normal este gen no se expresa hasta después de la polinización y fertilización. Esta diferencia explica el alto contenido de GAs presente en el ovario en antesis y el desarrollo partenocárpico del fruto. Además, los genes *SPY*, *LeT6* y *LeT12*, implicados en el control de la síntesis de GAs cuya transcripción está activada durante la antesis de manera normal, están reprimidos en este estadio en el mutante *pat*. Lo que indica que la mutación *pat* afecta al control de la síntesis de GAs al principio de la cascada de regulación.

El fenotipo *pat* se debe a la acción de un único gen recesivo con efectos pleiotrópicos (Philouze y Pecatau, 1986). El cartografiado de este gen se realizó a partir de un cruce interespecífico con *Solanum pennellii* (Correll) (Beraldi *et al*, 2004). Las plantas se clasificaron como portadoras del alelo *pat* en función de la presencia de anteras subdesarrolladas, ya que este carácter no es tan sensible como la partenocarpia al fondo genético ni a las condiciones ambientales. El cartografiado se realizó empleando marcadores AFLPs, cartografiados previamente, que permitieron localizar el gen en el brazo largo del cromosoma 3. Posteriormente la zona donde se encuentra el gen quedó reducida a 1,2cM mediante el empleo de SCARs

## Introducción

derivados de los marcadores COS. Sin embargo, no se detectó ningún posible gen candidato en la zona delimitada ni se encontró microsintenia con *Arabidopsis*. Por todo ello, hasta la fecha no se ha podido clonar el gen *pat*.

### 4.4.3 Partenocarpia en *Severanin*

La variedad *Severianin* es otra de las fuentes naturales de partenocarpia más estudiadas. Se desarrolló a partir de un cruce de Byzon (*S. lycopersicum*) con una F1 procedente del cruce Gruntovij Gribovskij (*S. lycopersicum*) x *S. habrochaites*. Philouze y Maisonneuve (1978) y Nuez y colaboradores (1986) caracterizaron la capacidad partenocárpica de esta variedad y dedujeron que era debida a la acción de un único gen recesivo al que denominaron *pat-2*. La hipótesis de un solo gen recesivo es la más aceptada, sin embargo Vardy y colaboradores (1989b) propusieron un modelo para la partenocarpia de *Severianin* basado en la acción de dos genes. Los autores cruzaron *Severianin* con 11 líneas distintas portadoras de marcadores fenotípicos asignados a los distintos cromosomas de tomate. Los resultados obtenidos en estos cruces no eran consistentes con el modelo de un gen recesivo, por lo que los autores propusieron un modelo de dos genes. *Pat-2* sería un gen mayor y un nuevo gen *mp* sería un gen menor que podría encontrarse presente en homocigosis en plantas sin capacidad partenocárpica. Además encontraron ligamiento de *pat-2* con genes situados en el cromosoma 3, aunque no fueron capaces de situar el gen *mp*. Este trabajo presenta varios problemas, por un lado, los autores no fueron capaces de localizar el gen *mp*. Además la clasificación de las plantas fue realizada en base al porcentaje de frutos partenocárpicos producidos por la planta, característica que está altamente influenciada por las condiciones ambientales. Por todo ello durante el resto de la tesis nos referiremos a la partenocarpia obtenida a partir de *Severianin* como *pat-2*, ya que es el modelo más aceptado.

La acción de *pat-2* confiere a la planta la capacidad de desarrollar frutos en ausencia de polinización y fecundación con las mismas características que los frutos semillados. La partenocarpia causada por la acción de *pat-2*, a diferencia de lo que ocurre con *pat*, no presenta efectos sobre el desarrollo reproductivo de la planta. Las flores están perfectamente formadas y cuando las condiciones ambientales lo permiten dan frutos con semillas. *Severianin* es, por tanto, una variedad partenocárpica facultativa. En esta variedad el porcentaje de frutos partenocárpicos

viene determinado por factores ambientales y endógenos. La temperatura parece ser uno de los factores más importantes. Las altas temperaturas favorecen la formación de frutos partenocárpicos (Lin *et al* 1983b), probablemente debido a dificultades en la polinización y al aumento de la tasa de crecimiento del ovario en estas condiciones. El tipo de crecimiento de la planta también parece estar relacionado con la capacidad partenocárpica, estando favorecido el desarrollo de frutos partenocárpicos en plantas de crecimiento determinado (Lin *et al*, 1984).

A diferencia de lo que ocurre con *pat*, en *Severianin* los frutos partenocárpicos tienen el mismo tamaño que los frutos con semillas. En esta variedad el desarrollo partenocárpico parece estar muy relacionado con el desarrollo de las cubiertas del óvulo para dar lugar a pseudoembriones. No existen frutos de tamaño grande que no presenten estas estructuras, ni frutos pequeños con pseudoembriones completamente desarrollados. Ello que sugiere que los pseudoembriones actuarían como sustitutos de las semillas, promoviendo el desarrollo del fruto y dando lugar a frutos de igual tamaño a los frutos con semillas (Kataoka *et al*, 2003).

El papel de las GAs en el desarrollo partenocárpico del fruto es de sobra conocido, los ovarios de las plantas *pat* tienen un mayor contenido en GAs (Olimpieri *et al*, 2007) y la aplicación de GAs induce el desarrollo del fruto (Wittwer *et al*, 1957). En *pat-2* esta hormona también juega un papel importante, Fos y colaboradores (2000) analizaron el contenido en GAs de plantas *pat-2* derivadas de *Severianin* y de líneas cuasi-isogénicas de éstas. Encontraron que el contenido en GA<sub>20</sub> era muy alto en los ovarios de las plantas *pat-2* ya antes de la antesis. Aunque GA<sub>20</sub> no sería activa, su acumulación aumentaría la síntesis de GAs activas, induciendo el desarrollo partenocárpico del fruto. Además de las GAs, en la partenocarpia de *pat-2* las poliaminas también parecen estar implicadas. El nivel de estas sustancias en los ovarios de plantas *pat-2* es más elevado que el de líneas cuasi-isogénicas no partenocárpicas, además la inhibición del desarrollo partenocárpico causada por la aplicación de paclobutrazol puede ser contrarrestada tanto por la aplicación de GA<sub>3</sub> como por poliaminas (Fos *et al*, 2003).

#### 4.4.4 Partenocarpia en RP75/59

La línea RP75/59 también posee un alto nivel de partenocarpia. Esta línea fue desarrollada por Reinmann-Philipp (1968) en Alemania a partir de un cruce entre “Atom” x “Bubjekosoko”. RP75/59 es capaz de producir frutos sin semillas de las mismas características morfológicas que los frutos normales, con desarrollo normal de los lóculos (Figura 9). No presenta malformaciones en las flores y las plantas son capaces de dar frutos con semillas cuando las condiciones ambientales lo permiten.



**Figura 9.** Sección de fruto partenocárpico de la línea RP75/59.

Al igual que ya ocurría en *pat* y *pat-2*, la partenocarpia en RP75/59 está mediada por la acción de las GAs (Fos *et al*, 2001). Cuando se aplica un tratamiento con paclobutrazol, un inhibidor de la síntesis de GAs, a las flores en anthesis, se impide el desarrollo de frutos en ausencia de fecundación. Sin embargo, este tratamiento es contrarrestado por la aplicación de GA<sub>3</sub>. Además, las concentraciones de diversas GAs en ovarios no polinizados de plantas partenocárpicas son significativamente superiores que en ovarios de plantas no partenocárpicas.

La línea RP75/59, a pesar de su alta capacidad para cuajar frutos, superior a *pat-2* (Scott, 1984 y Chareonboonsit *et al*, 1985), ha sido mucho menos estudiada. Esto se debe principalmente a que presenta un modo de herencia complejo, de hecho hay tres modelos de herencia propuestos

para explicar el control genético de este carácter, hecho que dificulta la introducción de éste en variedades no partenocárpicas (Gorguet *et al*, 2005).

#### *El modelo de Philouze*

Philouze (1989) estudió la heredabilidad de la partenocarpia de RP75/59. Mediante cruzamientos demostró que este carácter no era alélico a los de otras fuentes de partenocarpia descritas previamente (*pat*, *pat-2*). El carácter sería recesivo, puesto que al cruzar con una variedad no partenocárpica la F1 es incapaz de cuajar frutos en ausencia de polinización y fecundación. Los estudios con las generaciones segregantes le llevaron a concluir que la partenocarpia en RP75/59 estaría controlada por al menos 3 genes recesivos, probablemente 4 o 5, que estarían actuando independientemente, pero que tendrían efecto acumulativo.

#### *El modelo de Nuez y colaboradores*

Nuez y colaboradores(1986, 1988) propusieron un modelo para la habilidad de cuajar frutos sin semillas en RP75/59 basado en la acción de dos genes independientes parcialmente recesivos. Los autores denominaron a estos genes *pat-3/pat-4*. De acuerdo con este modelo, la línea RP75/59 sería homocigota para *pat-3* y *pat-4*. Estos genes serían parcialmente recesivos, ya que aunque en las condiciones climatológicas del sudeste español las plantas heterocigotas no son capaces de producir frutos partenocárpicos, las plantas homocigotas para uno de los dos genes y heterocigotas para el otro sí poseen capacidad partenocárpica.

#### *El modelo de Vardy y colaboradores*

Vardy y colaboradores (1989a) estudiaron la heredabilidad de la partenocarpia procedente de RP75/59 en condiciones de bajas temperaturas que únicamente permiten el cuajado de frutos sin semillas. Los autores proponen un modelo basado en la acción de tres genes recesivos independientes con efectos aditivos. Mediante estudios de ligamiento, usando 40 marcadores morfológicos distribuidos a lo largo del genoma del tomate, fueron capaces de encontrar ligamiento con dos genes. El gen *diageotropica* (*dgt*) situado en el brazo largo del cromosoma 1

## Introducción

y el gen *yellow verescent* (*yv*) situado en el brazo largo del cromosoma 6. Sin embargo, no fueron capaces de determinar la posición del tercer gen que proponen en su modelo.

Hasta la fecha, ninguno de los tres modelos ha sido universalmente aceptado y el control genético de este carácter sigue sin estar claro. Esto se debe probablemente a los diferentes criterios empleados para caracterizar las generaciones segregantes. Unos autores cultivan las plantas en condiciones desfavorables para la polinización, que pueden afectar a la expresividad del carácter, mientras otros castran las flores para evitar la polinización. También existe discrepancia en la clasificación de las plantas como partenocárpicas. Algunos autores clasifican las plantas en función del porcentaje de frutos que cuajan, siendo éste un carácter cuantitativo que luego se transforma en un carácter cualitativo al poner un punto de corte arbitrario para separar distintas clases. Sin embargo, otros autores no tienen en cuenta el porcentaje de frutos cuajados sino las características morfológicas de los frutos sin semillas, de manera que no tienen en cuenta los frutos con malformaciones o de pequeño tamaño. Estas dificultades a la hora de clasificar las plantas han hecho que la partenocarpia derivada de RP 75759 no se haya empleado en programas de mejora a pesar de que esta línea tiene mayor capacidad de producción que *Severianin*. Es por tanto necesario profundizar en el estudio de la genética de este carácter y determinar unos criterios claros para clasificar las plantas como partenocárpicas y no partenocárpicas, para hacer posible su empleo en los programas de mejora.

## **II. OBJETIVOS**



Uno de los procesos de desarrollo vegetal más importante para la producción agraria es el cuajado (reanudación del crecimiento del ovario) y el desarrollo del fruto, que puede verse afectado por multitud de factores, tanto abióticos como bióticos. En algunos casos el desarrollo del fruto sucede sin fertilización ni producción de semillas viables, a este proceso se le denomina desarrollo partenocárpico del fruto y puede ayudar a superar el problema de la baja productividad en condiciones en las que el desarrollo normal del fruto es limitado. El estudio de estos procesos es la base principal para la resolución de los problemas de cuajado, sin embargo se han realizado muy pocos estudios en tomate. El objetivo general de esta tesis es estudiar la base molecular del desarrollo del carpelo, cuajado normal y partenocárpico en tomate, lo que servirá de base para la mejora del cuajado en condiciones adversas.

En este trabajo se pretende:

1. Aislar genes implicados en el cuajado del fruto en tomate, mediante la técnica de sustracción de genotecas y mediante el análisis de la expresión génica en la especie modelo *Arabidopsis*.
2. Estudiar el desarrollo del carpelo en variedades partenocárpicas y no partenocárpicas de tomate mediante el análisis del transcriptoma.
3. Identificar genes implicados en el cuajado partenocárpico del fruto en la línea RP75/59.
4. Desarrollar y caracterizar una población F2 para la localización y estudio de los genes implicados en la partenocarpia de la línea RP75/59.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **1. Material vegetal**

En los estudios realizados en esta tesis se han utilizado dos líneas de tomate. Como variedad control se empleó UC82 y como línea partenocárpica RP75/59. La variedad UC82 fue desarrollada en la Universidad de Davis alrededor de los años 70. Se trata de una variedad de crecimiento determinado y maduración muy agrupada, que produce frutos oblongos muy firmes (Nuez, 1995). Ha sido muy empleada para producir tomates para procesado industrial, pero también en investigación, por ejemplo, para producir plantas transgénicas con capacidad partenocárpica (Pandolfini *et al* , 2002). La línea RP75/59 fue desarrollada por Reinmann-Philipp (1968) en Alemania a partir de un cruce entre “Atom” x “Bubjekosoko”. Es capaz de producir frutos sin semillas de las mismas características morfológicas que los frutos normales, con desarrollo normal de los lóculos.

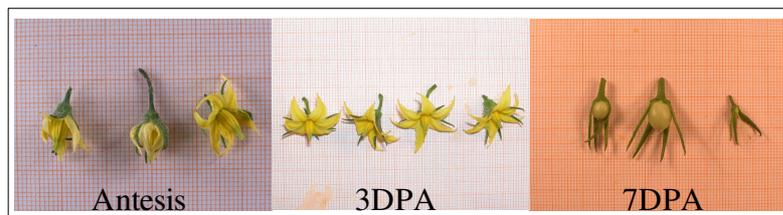


**Figura 10.** Cultivo del material vegetal en los invernaderos del COMAV.

## Materiales y métodos

Todos los materiales empleados proceden de plantas cultivadas en los invernaderos del COMAV, en condiciones de temperatura entre 24 y 14°C y fotoperiodo de 16 horas. Las plantas se cultivaron en macetas de 35cm de diámetro por 35cm de altura, en sustrato de fibra de coco y empleando el fertilizante habitual para tomate en la zona de Valencia (Figura 10).

La sustracción de genotecas se desarrolló a partir de material procedente de flor entera de la variedad UC82, cultivada en el periodo primavera/verano del 2006. Las flores se polinizaron manualmente en antesis (momento de la apertura de los pétalos y liberación del grano del polen). Se recolectó 1g de flores en antesis, y a intervalos de 24h hasta 7DPA (Figura 11). Estas flores se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

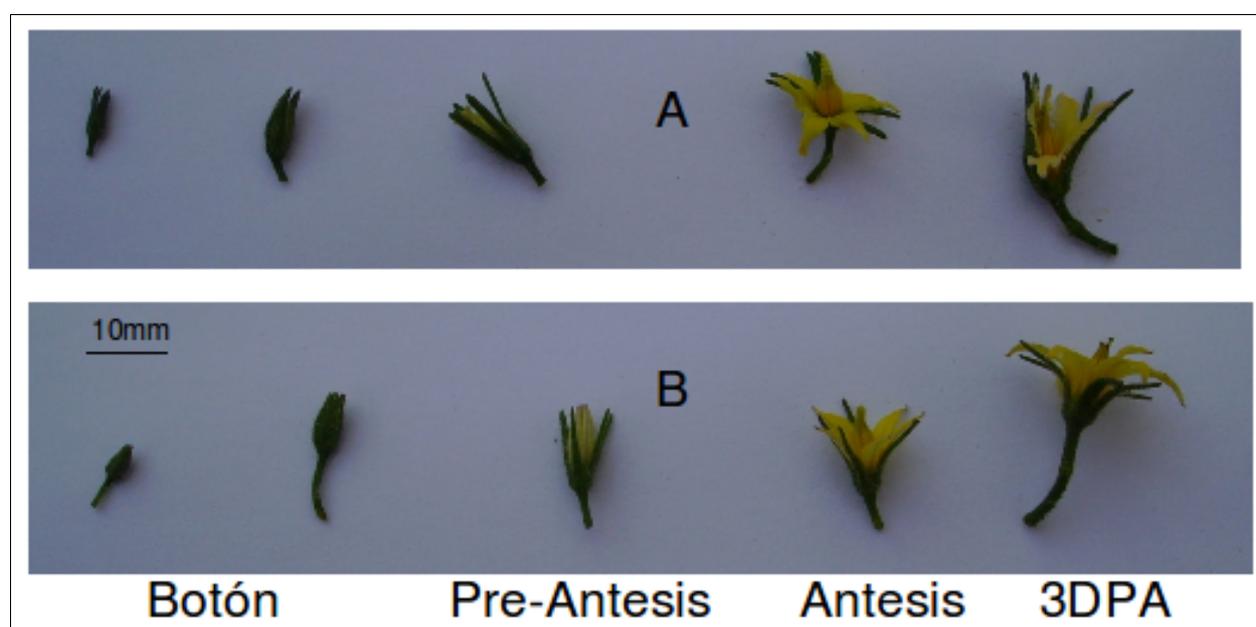


**Figura 11.** Flores en antesis, a 3DPA y a 7DPA.

El análisis de la expresión génica de los genes identificados a partir de los datos del microarray ATH1 de *Arabidopsis* se realizó en carpelos de la variedad UC82 (cultivada en primavera/verano 2006) procedentes de flores polinizadas manualmente en antesis. Las flores se recolectaron: dos días antes de la antesis, en antesis, a intervalos de 24 horas hasta 7DPA y a 12 DPA. Inmediatamente se extrajeron los carpelos (150mg), se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

Las hibridaciones del GeneChip Tomato Genome Array de Affymetrix se realizaron con material de la variedad UC82 y de la línea RP75/59 (cultivadas en primavera/verano 2007). Para llevar a cabo el estudio del desarrollo del carpelo y cuajado normal del fruto, se seleccionaron cuatro estadios de desarrollo: botón floral (longitud de los pétalos entre 4,5 y 7mm), de botón floral a pre-antesis (longitud de los pétalos entre 7,5 y 9mm), antesis y 3DPA (tras polinizar manualmente en antesis) (Figura 12). Se recogieron flores de ambas líneas en los 4 estadios de

desarrollo durante tres semanas seguidas, para obtener triplicados biológicos. Rápidamente se extrajeron los carpelos (150mg), se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para llevar a cabo el estudio del cuajado partenocárpico del fruto se emascularon las flores dos días antes de la antesis y se polinizó en antesis la variedad control UC82. Se seleccionaron los estadios de antesis y 3DPA, y se recogieron flores en tres semanas distintas. Rápidamente se extrajeron los carpelos (150mg), se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 12.** Estadios de desarrollo floral empleados en el análisis del desarrollo del carpelo y cuajado del fruto mediante hibridación de microarrays. **A.** RP75/59. **B.** UC82.

A partir de las líneas UC82 y RP75/59 se desarrolló una población F2 segregante para la partenocarpia. Para obtener la F1 se empleó UC82 como parental femenino, las flores fueron emasculadas antes de la antesis e inmediatamente polinizadas con polen procedente de RP75/59, tras lo cual se embolsaron para impedir que pudieran ser polinizadas. A partir de las semillas obtenidas se plantó una única planta F1 para desarrollar una F2 segregante. Las flores de la F1 se embolsaron antes de la antesis para asegurar que las semillas obtenidas procedieran de una autofecundación. La caracterización fenotípica de la población segregante se llevó a cabo durante noviembre de 2008 y abril de 2009. Se caracterizaron 142 plantas de la F2, la F1 y los parentales.

## *Materiales y métodos*

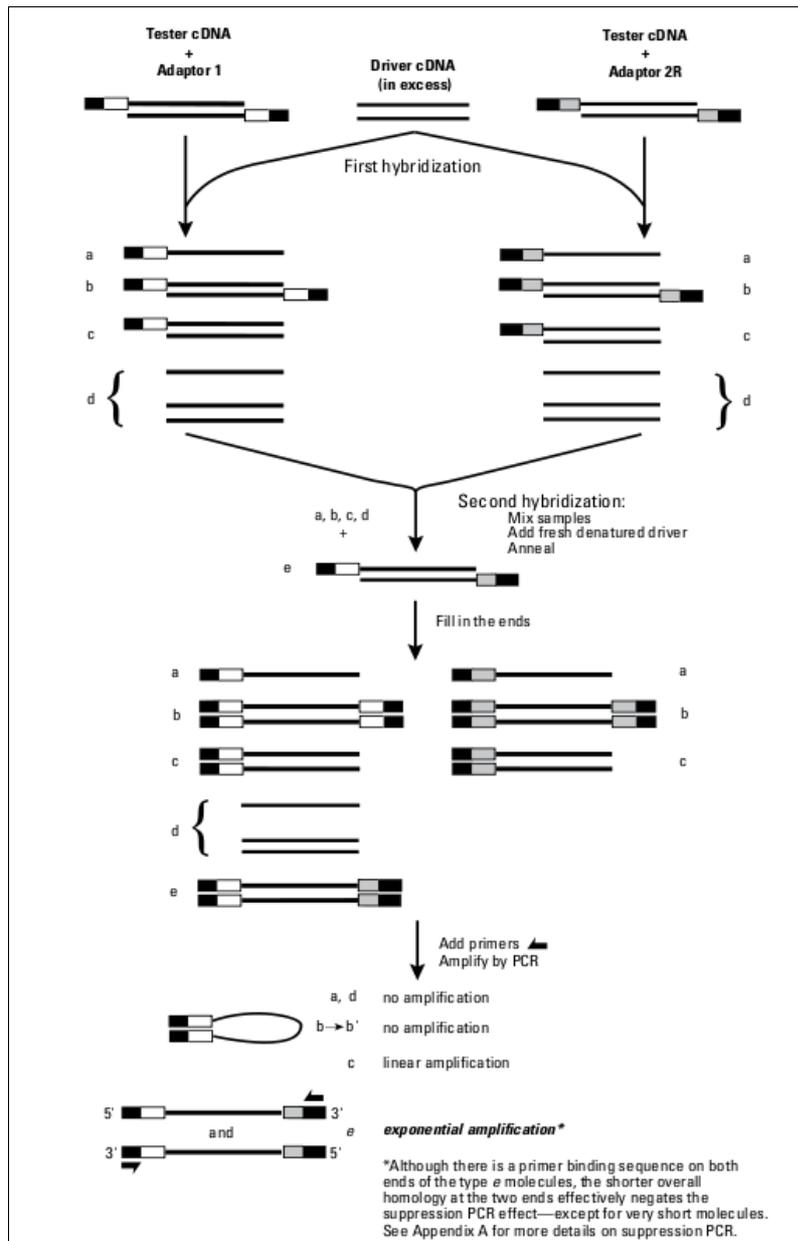
Las plantas se cultivaron a dos guías, una para evaluar la partenocarpia y otra para evaluar el cuajado tras polinizar. Se caracterizaron cuatro ramilletes por guía y tres flores por ramillete con objeto de evitar fenómenos de competencia entre frutos. Todas las flores caracterizadas fueron emasculadas dos días antes de la antesis, pero únicamente se polinizaron las de la guía empleada para evaluar la capacidad de cuajado tras polinizar. El análisis de la expresión génica en plantas procedentes del cruce entre la variedad UC82 y la variedad RP75/59 se realizó con flores en el estadio de antesis. Se recogieron flores de 16 plantas de la F2, la F1 y de ambos parentales en el estadio de antesis (150mg), se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

## **2. Sustracción de genotecas**

La sustracción de genotecas se realizó a partir de ARNm procedente de flores de la variedad UC82 en los estadios de antesis y 3DPA. La extracción de ARN total se realizó siguiendo el protocolo descrito por Bugos y colaboradores (1995), basado en una precipitación selectiva con LiCl. El ARNm se purificó mediante columnas de oligo(dT)-celulosa siguiendo el protocolo descrito en kit ARNm Purification Kit Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Alemania). A partir de este material se realizó la sustracción de genotecas con el kit Clontech PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, EEUU). La sustracción propiamente dicha consta de siete pasos:

- 1) **Síntesis del ADNc.** Se sintetizó el ADNc partiendo del ARNm. La transcripción reversa se llevó a cabo utilizando como cebador un oligodT con dianas para los enzimas de restricción Rsa I y Hind III en el extremo 3'. Posteriormente se sintetizó la segunda cadena de ADNc.
- 2) **Digestión.** Se digirió ADNc con el enzima Rsa I, que corta en el cebador empleado para la síntesis y, al ser un enzima de corte frecuente, en alguna de las otras zonas de los ADNc.

- 3) **Ligación.** Se disponía de dos poblaciones de ADNc, de una (3DPA, tester) se pretendía aislar los genes que no estaban presentes en la otra (antesis, driver). Para ello, de la muestra tester se tomaron dos alícuotas, una de las cuales se ligó con el adaptador 1 y la otra con el adaptador 2R.
  
- 4) **Hibridación 1.** Se realizó una primera hibridación en la que se mezcló ADNc de la muestra tester ligado con el adaptador 1 y un exceso de ADNc de la muestra driver no ligada. De forma independiente se repitió con el ADNc tester 2R. Ambas mezclas se desnaturalizaron y se dejaron renaturalizar a 68°C durante 8 horas. De manera que, cuando un determinado fragmento se encontraba presente en ambas poblaciones se formaron híbridos tester-driver y en el caso de los fragmentos diferenciales presentes únicamente en la muestra tester se formaron moléculas tester-tester y tester de simple cadena, dependiendo la frecuencia del transcrito (Figura 13).
  
- 5) **Hibridación 2.** Las dos hibridaciones (tester 1 y tester 2R) se volvieron a hibridar entre si a 68° 16 horas, sin desnaturalizar, en presencia de un exceso de ADNc driver. De este modo se consiguió la creación de híbridos tester1-tester2R. A parte de este tipo de moléculas, en la muestra final, se obtuvieron híbridos, tester1-tester1, tester2R-tester2R, tester1-driver, tester2R-driver (Figura 13).
  
- 6) **Amplificación 1.** Tras estos pasos de hibridación se produce la amplificación de los fragmentos diferenciales. En la primera PCR se empleó un cebador homólogo tanto del adaptador 1 como del 2R. La conformación de los cebadores y adaptadores es tal que se produce la amplificación específica de las moléculas tester1-tester2R (Figura 13).
  
- 7) **Amplificación 2.** En la segunda PCR se emplean cebadores específicos para cada uno de los adaptadores, de manera que se consigue amplificar aun más las moléculas tester1-tester2R y reducir el ruido de fondo (Figura 13).



**Figura 13.** Esquema del procedimiento de sustracción (manual del Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit).

Los productos de la segunda PCR se clonaron directamente en un vector plasmídico con el sistema InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Hanover, EEUU). Los clones se secuenciaron usando el protocolo descrito en Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers Sequencing Chemistry Guide (Applied Biosystems, Woolston, Reino Unido), empleando como cebador el cebador específico del adaptador 1. En los casos en que el adaptador 1 se ligó en el

extremo oligodT se empleó el cebador específico del adaptador 2R. Las reacciones se analizaron en un secuenciador capilar ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). La limpieza, ensamblaje y agrupación de las secuencias se llevo a cabo con el programa Staden ([http://staden.sourceforge.net/staden\\_home.html](http://staden.sourceforge.net/staden_home.html)). Para determinar a que genes correspondían nuestras secuencias se realizó un BLAST (Altschul *et al*, 1990) contra la base de datos de tomate del TIGR (LeGI 11.0). Una vez determinado a qué gen correspondía cada uno de los clones de la genoteca se emplearon las secuencias del TIGR para los análisis posteriores.

### **3. Extracción de ARN total, retrotranscripción y PCR cuantitativa**

La extracción del ARN total se realizó siguiendo las instrucciones del kit TRI reagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU). El ARN total fue incubado con DNase I (Roche, Nonnenwald, Alemania) para eliminar cualquier contaminación con ADN genómico. La validación de la sustracción y del GeneChip Tomato Genome Array de Affymetrix se realizó con el ARN utilizado en los respectivos experimentos.

El ADNc se sintetizó a partir de 1µg de ARN total empleando un cebador que contenía una cola oligo d(T) con el enzima Expand Reverse Transcriptase (Roche). Este material fue utilizado para las PCR cuantitativas a tiempo real, que se realizaron en un ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) con la mezcla de reacción Absolute SYBR Green ROX Mix (ABgene, Epsom, Reino Unido). Los cebadores empleados en estos ensayos se diseñaron con el programa Primer Express de Applied Biosystems (Tabla 2). Cada una de las reacciones de PCR cuantitativa se realizó por triplicado. Una vez obtenidas las curvas de amplificación se calculó la eficiencia de cada reacción con el programa DART-PCR 1.0 (Peirson *et al*, 2003; <http://www.gene-quantification.de/peirson-dart-version-1.pdf>). Con este dato se calculó la expresión relativa de cada uno de los genes, con el algoritmo descrito por Liu y Saint (2002), empleando la actina como gen de referencia. Por último, se calculó la media de los triplicados y el error asociado.

**Tabla 2.** Cebadores empleados en los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real.

Cebador	Directo	Reverso
ACTINA	AAGATGGCAGACGGAGAGGATA	TGCGAACCCAGCCTTGAC
PCNA	GAACGATGCGAACTTTGATTGTT	TGGAGTCCATGGCTTGCA
TC177661	GGGCAAAGTGGAGCCATGT	AACAGCTTACTTCTGGCTCTGATAA
TC171919	GCACAACCTCCACGGTTCCTACT	AAATAACGATGGCCAGCTTGA
TC180002	CTTGCGGACAGATGCTTGAA	GTTCCAGAAGGCACGCATTT
TC172546	GGGACAACCTGGATCGGTACGT	TGCTCTAATGTGTTCTTGCAACAG
TC180398	GTATTTGTTGCTCCCTTAGGCATT	AAAAACTGATAGGAGAAGTGGCATGTA
TC176776	GTGTCACCGGCGATTGAAC	CTTCCCAAAGCGCTACAGAA
TC170549	CCATGAACACCCTTAGTGATGAGT	GGAGTCCCATGGTTTTCTTAGTTT
TC170845	CACAACAGCTTGACCGGACAT	GAGAAATCAAGCGTGGAAAAATTC
TC174950	CAGAGGCAAAGGGAAATGCA	GACCTGCTGGACACATTGTGTT
TC175253	TGAAAAGTTTGCGGATGAAAATT	CCAGCATTGGCCATTGACAA
TC183105	GGAACAATTCGGGAAGGATGA	CAGTTCAGCCATAAATGATCTCT
TC185802	ACCCCACTTACAATCCCTAAAGG	TCGATGTTCTTTCCAATCTGAAC
TC180501	AATCCCAAGTATTCAATATGGGAGAT	GAGCAACAATTTGTGCATCCA
BP892749	GACGCTGGTGATACGAAGCA	CGTACTTGCATCCCTCTTCTTCA
TC170127	AAGCGCCATCCTCGTAGGA	GCAGTGCTCAAGGAGGAAACA
TC171323	CGCAGCAAATCCAACATGAG	GCCACATCAAATACCTCCTTTGT
TC173634	CATGGGCTTCGCTTCTTAGC	TGGAGTCGGAAAATGACCAA
TC176031	CGGTGGCAACTTCACTTCAA	TGCAGCCGCAAATCCA
TC179613	CAGAGTTTTGAAGCACTGAATCAAC	CCACCTCCCTTTAAACTCTGA
TC180040	GCTGGCTACCATGGAGCTTAA	TGCAAGGCACAACCATATTG
TC180719	CCGAGGAGGCAACTCAAA	GGTCGCTCACCTCATCTTTC
TC188286	CCTTTTCAGTTTCCCTTAATGGA	TCTTTCGACAGCCGGTTCT
TC178485	GGAGCTAATCCTGAAGTTGCGATA	TTATAGCCAACGGGACGATTG
TC173021	CAACCTAAGGCTGGAGCAGAGT	GCCCGTTCAATGGCAACTT
TC173238	CGACATTCGCTCAGCTTATCG	CTGGATTCTTCGCCCACCTA
TC173999	TGACGGAACGACTCCGAATC	AAGTCTCCCAGCCAAAAATCA
TC178258	AAGGCAATGGGCACCAGTAT	CGGAAAACCTAAATGCCTTCTCTGT
TC170885	CAGTAACGATGACGCGCTTTAA	TGCCGGCTAGGCATTATTCT
TC189147	AAGGATGCTTTGTCAAAGGTTCTT	TCATTTCTGGCTAATTGTCAATC
TC179551	GGTGTGTTAATTGGAGCAGATTTT	CTATTGAGGAAAGGGCCAAGAG
TC174046	GCGTTGACAGAGGGTGGATT	CGTCTTTTTCAGCTGTTTATTAGG
TC187856	TGATACGCTGGTTTCATTGGT	CACCTCCCGATGCCTTCA
TC173336	CTTAGACGGATCAGGTGAGAAAGAT	CCTCTCCATGGTCGCCAAT
TC172016	GCAGCAATCCGGCTAATACATT	CGAGCAGAGTGTTTTCTAATCCAA
TC170923	CCGATGTGGGAAGAAATGCT	TCAAAGTCAAATCCTGCAATATTG
TC171801	CCACTTCCTTGATGCCATCA	TCCTCCGCCGAGAGATTG

**Tabla 2.** Cebadores empleados en los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (cont.).

Cebador	Directo	Reverso
TC178469	GCCGTTGAAGCCTTGAAGAG	GTGCTTCTACAACAACATCATCCAT
TC187075	TCGACGATTAGGAACGTACGATAC	GACGGCGTAACCTCCGATATT
TC173525	CCTAGAGGAGAATAACATGCTAACCAA	TTAGTTTGCTGGTGCCATTAC
TC171799	CAATTGTTTCGATCTGTACCAGAAGAC	TTAGCTGCTCTTGCATTTTCTCA
TC173474	CTTCGAAATCAAGCTACCTCCAA	CAGGGATCGAACTTATAGACATCAAC
TC174337	TGACATCGCCGGTGCTAAG	CCAATTTGGTGGTGATCTGCTA
TC175780	GGCATTGAAGGGAGGTTACTATGAT	GAGGAGAAAGACCGAACTCAAGTC
TC178971	GCAGAGGAGGTACGTGCATTATT	CGCCTTGCCAACGAACTC
BG643749	TGATCATGAACGTGCCTTTTTAGA	GATCAACTCCTGCACCTTGCT
TC179282	CAACTTGCCAAAGGTCAAAGC	GATGGGCAAACCTCGAGAATCA
TC179416	CGTTGCTCGCCATTTTGG	GCCCAGGAATGGAACCTTGT
TC170315	GAAAATGGTATTGGTGTGGTGAAG	TGCTCGCCAAAGTGGCATA
TC172875	TCAGAAAATGTGCAAGAGAGTAGTGA	TGCAAGTAATCCTGGCATGAAA
TC169960	TGGCCCTGACCCTTCAATAG	TCCGTTTTGTGGACATAATGCT
TC182754	GTGGATCCTGACAGATGGGAAT	TCGTCTTCAAAAGATGCTTTTTGC
TC174926	CGCCGTGCAGGACAAACT	TCTTGCACAACCTGGTTGTCTTG
NP211475	TGTGGAACCAGGTTTCGACAGTA	TGCTCCCTCTGCAACTGCTA
TC187704	GGGTGTTCTTGAATCCCTTGTC	GTGAGACTTTATTCGAACATTCAACAG
TC174576	TTCGAGTTGAAGGCTCTCATGA	CGAGAGATCACGTCACAAGTCAAT
TC177254	CAGGGTGGACCTGGAGCAT	TTAGTGTCCAATGGCCCAATTT
TC176054	AAGGTGCAAGTTGAAGATGGAAA	TTACCGTGGAATTCGTCCTTCT
TC183250	CTCTTGCCAACAGTGGTAAACCT	TCCTGAAGCAGAATCCTTTCCA
TC174453	GCCTTCTTCGGGCATGAA	CACTGAAGCCTCGAGATCTGAA
Les.9.1.S1_at	GCACTTTCATCTGTTCGGCTTT	TGGACGCCACTTTGATCCTT
Les.63.1.S1_at	CACATCATTAAACCATTCTCCATCAA	GAGTGATGGTGTGCCACTCATT
Les.64.1.S1_at	ATTCGATAATGAGACTCAACTACTATCCA	AATGAGGCCCCGTTCTCTAA
Les.65.1.S1_at	ACCAGATCTTGC GTTAGGAACTG	CCTGAGACGTTGTCTTGATGGA
Les.3520.1.S1_at	TGGACTGCTGTTACAAGCT	AACACCACTGGACTACCAGGTACT
Les.4978.1.S1_at	TTGCAAAGGCTGGGATCACT	TCCCCATGCAGGATTAGCA
Les.5343.1.S1_at	ATCATCTCCATTCTTCAGCAAAGA	CCGTGCACATAGTTCCAATGC
Les.5917.1.S1_at	GATGCCGGTTATCGACTTCAGT	CACAAGCCTGATGGAGAAGTGA
LesAffx.67531.1.S1_at	TTTGGCTAAGATGTTTAGCTCCTTTAC	GATCCATCAATTTGCTCTCATCA
Les.3707.1.S1_at	GAAAGAACATTTTAGAAGCGAGCTATG	CCTTGAGTAATTGTGGATAACTTTTGTA
Les.2902.1.S1_at	GGATGGTCAGGAAAAATGATCAA	CCCATCTCCTTTTGGTGCAA
Les.37801.1.S1_at	TGACCAAACCTCCTCTCCAGCTT	GAAGAGCCTTGACCCCAAATT
Les.5885.1.A1_at	GCAGCAGTTTCAGTGGATTCAA	TCAATGAATCATCTGTGGTGATTTC
Les.5941.1.A1_at	AGGCACTGCCAGTTTTACAT	GGGCTACTAAGGTGGTTTCTAGCA
Les.Affx.4763.1.S1_at	TGGACAACAAAAAGTTACCCTGAA	GGTGCAGAAGCAAGGCTTTTC

Se realizaron PCRs cuantitativas a tiempo real para: identificar el estadio en que se reanudaba la división celular tras la antesis, validar los resultados de la sustracción de genotecas y la hibridación del GeneChip Tomato Genome Array de Affymetrix, caracterizar la expresión génica de los genes aislados con el microarray ATH1 de *Arabidopsis* en tomate y caracterizar la expresión génica en plantas de la F2.

#### **4. Hibridación del Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array**

La extracción de ARN total se realizó siguiendo las instrucciones del kit TRI reagent (Sigma-Aldrich). El ARN total se purificó con el RNeasy plant mini kit (Quiagen, Hilden, Alemania). La síntesis del ADNc se llevó a cabo como indica el Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix, Santa Clara, CA, EEUU). A partir del ADNc la hibridación, tinción, lavado y lectura de los microarrays se realizó en el laboratorio UCIM de la Universidad de Valencia (Valencia, España) según el protocolo de Affymetrix. En total se realizaron 36 hibridaciones. Para analizar el desarrollo del carpelo y cuajado partenocárpico del fruto, se hibridaron carpelos en 4 estadios de desarrollo: botón floral, pre-antesis, antesis y 3DPA, utilizando los tres replicados biológicos. Se emplearon la variedad UC82 y la línea RP75/59. Para analizar el cuajado partenocárpico del fruto se analizaron carpelos en dos estadios de desarrollo: antesis (emasculando las flores dos días antes) y 3DPA (emasculando las flores dos días antes y polinizando en antesis las de la variedad UC82). Se empleó la variedad UC82 como control y la línea RP75/59 como modelo de cuajado partenocárpico.

#### **5. Análisis de microarrays, identificación de genes diferenciales**

##### 5.1 Análisis del Affymetrix ATH1 *Arabidopsis* Array

El análisis de la expresión génica en *Arabidopsis* se realizó a partir de los datos de Schmid y colaboradores (2005). Este grupo desarrolló el proyecto AtGenExpress con objeto de

proporcionar un atlas de expresión génica en la especie modelo *Arabidopsis*. Este atlas contiene hibridaciones de más de 70 muestras, que incluyen diversos tejidos en distintos estadios de desarrollo. En este ensayo hibridaron cada muestra por triplicado con el Affymetrix ATH1 *Arabidopsis* Array, que contiene sondas para determinar la expresión de más de 20000 transcritos. Los autores hicieron públicos todos los datos derivados de este proyecto, que están disponibles en la red (<http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress/>).

De todas las muestras incluidas en el proyecto AtGenExpress se seleccionaron tres para estudiar el cuajado del fruto en *Arabidopsis*. La hibridación ATGE\_37 contiene datos de carpelos en el estadio 12 de desarrollo, que equivale a pre-antesis, ATGE\_45 corresponde a carpelos en el estadio 15, el momento de la fecundación y ATGE\_76 contiene datos de silicuas en el estadio 3, el más temprano de los estadios del fruto que incluye el atlas AtGenExpress. Para identificar los genes regulados a lo largo de estos estadios se reanalizaron los datos con el programa TIGR MeV versión 3.1 (Saeed *et al*, 2003). Se empleó un análisis SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher *et al*, 2001), que permite determinar si los cambios de nivel de expresión de un gen entre dos muestras son estadísticamente significativos. Primero asigna un valor a cada gen en función de los cambios de expresión entre muestras con respecto a la desviación que existe en los triplicados de la misma muestra. Luego se consideran diferenciales los genes con un valor superior a un determinado umbral y se calcula el porcentaje de genes que se han considerado diferenciales y no lo son, FDR (false discovery rate). El FDR se estima analizando permutaciones de los datos. Por último el valor umbral para considerar un gen diferencialmente expresado se ajusta en función del FDR con que se desee trabajar. Al analizar los microarrays de *Arabidopsis* se empleó un umbral ( $\Delta$ ) ajustado a un FDR menor del 2%. Tras este análisis se exigió que los genes tuvieran una variación en el nivel de expresión entre estadios superior a 4 veces. Se realizaron tres tests comparando: ATGE\_37 con ATGE\_45, ATGE\_45 con ATGE\_76 y ATGE\_37 con ATGE\_76. Se fusionaron los resultados de los tres análisis y se eliminaron los genes duplicados.

*5.1.1 Identificación de genes ortólogos y análisis de conservación entre especies*

El análisis para determinar los genes ortólogos entre *Arabidopsis* y tomate se realizó a partir de las secuencias de tomate contenidas en la base de datos de tomate del TIGR (LeGI 11.0) y las secuencias de *Arabidopsis* de la TAIR6. Se empleó el método “all-against-all BLAST”. Primero se realizaron dos comparaciones tblastn de la base de datos de tomate contra la de *Arabidopsis* y viceversa. Posteriormente se asignaron ortólogos cuando los dos BLAST dieron resultados recíprocos. Para tener en cuenta los resultados del BLAST el primer hit debía tener un e value (valor esperado)  $\leq E^{-15}$  y una diferencia con el e value del siguiente hit superior a un orden de magnitud.

Los genes diferenciales con ortólogo en tomate se agruparon empleando el algoritmo SOTA (Herrero *et al*, 2001), especialmente desarrollado para agrupar genes en función del patrón de expresión. Este algoritmo desarrolla un árbol binario comenzando por los niveles superiores, de manera que la diferenciación de nuevos grupos puede frenarse en el momento que se desee. Para agrupar los genes, primero se calculó la expresión media para cada gen en cada estadio, luego en función de estos valores se calculó la distancia entre los genes con el coeficiente de correlación de Pearson. En base a estas distancias los genes se agruparon en 7 clusters. Se seleccionaron al azar un 10% de genes de cada cluster para caracterizar el nivel de expresión en tomate.

Los genes con ortólogo en tomate cuya expresión era constante en las muestras ATGE\_37 (carpelos en el estadio 12), ATGE\_45 (carpelos en el estadio 15), ATGE\_76 (silicuas en el estadio 3), ATGE\_77 (silicuas en el estadio 4) y ATGE\_78 (silicuas en el estadio 5) se aislaron mediante un análisis SAM que incluyó todos los estadios. De entre los genes constantes se seleccionaron aquellos que presentaban variaciones del nivel de expresión superiores a 4 veces en alguna de las muestras incluidas en el resto de hibridaciones del proyecto AtGenExpress. Entre éstos se seleccionaron 8 genes al azar para caracterizar su patrón de expresión en tomate.

## 5.2 Análisis del Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array

El Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array está diseñado a partir de las secuencias de la base de datos GeneBank (*Lycopersicon esculentum* UniGene Build #20 y GenBank mRNAs hasta el 5 de noviembre de 2004). Este microarray contiene más de 10000 sondas que permiten determinar el nivel de expresión de 9200 transcritos de tomate. Los detalles del diseño de este microarray se encuentran en la página web de Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>). El microarray se empleó para analizar el desarrollo del carpelo y cuajado normal del fruto y para analizar el cuajado partenocárpico del fruto.

Se realizaron 36 hibridaciones distintas a partir de carpelos en distintos estadios de desarrollo. Para cada variedad se hicieron triplicados de los estadios de: botón, pre-antesis, antesis, 3DPA, antesis emasculada y 3DPA emasculada. El dato bruto de la hibridación de los microarrays se analizó con el programa affy (Irizarry *et al*, 2003) de Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). A partir del dato bruto se aplicó la corrección RMA para eliminar ruido de fondo, se normalizó el nivel de expresión por cuantiles, se ponderaron los datos de cada una de las sondas por el método medianpolish y se transformaron los datos de expresión a una escala log<sub>2</sub>.

El análisis de la expresión de los genes se realizó con el programa maSigPro (Conesa *et al*, 2006) de Bioconductor. MaSigPro es un programa especialmente diseñado para analizar experimentos de microarrays en los que una de las variables es el tiempo. El programa emplea una estrategia de regresión para encontrar genes diferenciales. En una primera fase del análisis se definen las variables a analizar en función del diseño experimental, y en base a estas variables se define un modelo de regresión general para los datos. Para el análisis del desarrollo del carpelo y cuajado normal del fruto se definió una regresión cúbica, puesto que se tenían 4 estadios temporales. Para el análisis del cuajado partenocárpico del fruto se empleó una regresión lineal, puesto que se trabajaba con dos estadios temporales. Posteriormente, el modelo definido se ajusta a los datos problema mediante mínimos cuadrados y se identifican los genes que difieren

significativamente de este modelo de regresión aplicando un determinado FDR (porcentaje de genes considerados diferenciales que no lo son). Se empleo un FDR del 1% ( $Q=0,01$ ) para los análisis. Una vez obtenidos los genes diferenciales, se aplica un procedimiento de selección que permite identificar para cada uno de los genes diferenciales la variable o variables, que causan la desviación del modelo general. Para esto se emplea una regresión stepwise y se calcula la probabilidad (alfa) para cada variable de ser la causante de la desviación. En el análisis se exigió un alfa de 0,01 para asignar los genes a las distintas variables. Tras el análisis, se obtuvieron las listas de genes diferenciales en función de cada variable. Además se exigió una diferencia de 0,75 (trabajando en escala  $\log_2$ ) para considerar los genes diferenciales.

La agrupación de las muestras hibridadas en función del nivel de expresión de los genes se realizó con el programa TIGR MeV version3.1 (Saeed *et al*, 2003), empleando el método UPGMA (bootstrap 100), y la distancia euclídea. En este análisis se emplearon únicamente los genes diferenciales para evitar ruido de fondo.

La agrupación de los genes en función del patrón de expresión se realizó con el método K-means (Hartigan y Wong, 1978). El cálculo de las distancias se realizó con el coeficiente de correlación de Pearson.

## **6. Análisis funcionales**

Los análisis funcionales de los genes aislados mediante la sustracción de genotecas, con el ATH1 Arabidopsis Array y con el GeneChip Tomato Genome array se realizaron empleado los Gene Ontology terms (términos GO) (Ashburner *et al*, 2000). Los términos GO se desarrollaron para proporcionar información lo más precisa posible de la función de los genes. Por ello y para evitar inexactitudes debido a la traducción al español, en esta tesis se ha mantenido la nomenclatura original en inglés. Los términos GO se organizan en tres categorías: función molecular, proceso biológico y localización celular. Dentro de cada categoría los distintos términos se organizan en redes jerárquicas de distintos niveles. Conforme mayor es el nivel más descendemos en la red y la información que nos proporcionan los términos es más precisa.

### 6.1 Análisis funcional de la sustracción y del Affymetrix ATH1 *Arabidopsis* Array

El análisis de los genes aislados mediante la sustracción de genotecas se realizó con la anotación de la base de datos del TIGR (LeGI 11.0), una vez determinado mediante comparaciones BLAST contra la base de datos de TIGR a qué gen correspondía cada uno de los clones de la genoteca. Se calculó el porcentaje de genes para cada término GO en nuestra genoteca y en todos los genes de la base de datos.

El análisis funcional del Affymetrix ATH1 *Arabidopsis* Array se hizo con el programa Babelomics (Al-Shahrour *et al*, 2006) en el servidor informático del Centro de Investigación Príncipe Felipe (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>). Babelomics incluye la anotación del microarray de *Arabidopsis*. La detección de los términos GO que estaban estadísticamente sobre o sub-representados en los genes diferenciales con respecto al resto de genes del microarray se realizó con la herramienta FatiGO (Al-Shahrour *et al*, 2004). FatiGO primero transforma dos listas de genes (en nuestro caso genes diferenciales y el resto de genes del microarray) en dos listas de términos GO de acuerdo con la anotación de los genes. Posteriormente, aplica un test estadístico para determinar que términos GO están sobre o sub-representados en una de las listas con respecto a la otra. Este análisis se realiza aplicando una corrección que tiene en cuenta el gran número de comparaciones que se están realizando simultáneamente (FDR). Una de las ventajas del FatiGo con respecto a otros análisis es que tiene en cuenta la naturaleza jerárquica de los términos GO. El análisis se realiza por niveles, pero al analizar un nivel los genes anotados con términos GO de niveles inferiores toman la anotación del término del que derivan, lo que aumenta la potencia del test estadístico. Mediante este procedimiento se compararon los genes diferenciales obtenidos con el análisis SAM con el resto de genes del microarray y los genes diferenciales con ortólogo, con el resto de genes con ortólogo del microarray.

Además del análisis con el FatiGO, se calculó el porcentaje de genes para cada término GO en todo el microarray y en los genes ortólogos para comprobar que no hubiera ningún sesgo, o desviación, como por ejemplo términos en los que se hubieran asignado muy pocos ortólogos.

## 6.2 Anotación y análisis funcional del Affymetrix GeneChip Tomato Array

A diferencia de lo que ocurría en *Arabidopsis*, en el caso del Affymetrix GeneChip Tomato Array la anotación que proporcionaba Affymetrix únicamente cubría alrededor del 15% de los genes representados. Este porcentaje es insuficiente para poder realizar un análisis funcional a nivel global, por ello se re-anotó el microarray empleando el programa Blast2GO (Conesa *et al*, 2005). para llevar a cabo la anotación primero se realiza un BLAST para identificar secuencias similares a las secuencias que se quieran anotar, después el programa analiza los términos GO de cada uno de los hits similares a la secuencia problema y en función de estas anotaciones el programa realiza la anotación de la secuencia problema. Tras este análisis se emplea el programa InterProScan, que busca dominios de proteínas en nuestras secuencias, a partir de estos dominios funcionales se asignan nuevos términos GO.

Las secuencias de las sondas del GeneChip Tomato Genome Array se obtuvieron de la página web de Affymetrix. Con estas secuencias se hizo un blastx contra la base de datos NCBI nr (con fecha 09-11-2007). Se exigió un E-value mayor a  $10^{-10}$  para considerar los resultados del BLAST. Además del BLAST, se compararon las secuencias contra la base de datos de proteínas InterPro con el programa InterProScan. Finalmente los genes se anotaron con el término GO de mayor nivel. Esta anotación se introdujo en el Babelomics y los análisis funcionales se realizaron con el programa FatiGO. Se compararon los distintos grupos de genes diferenciales, con el resto de genes del microarray. Además, se calculó el porcentaje de genes para cada término GO en los distintos grupos de genes diferenciales para tener una visión general de todos los procesos biológicos implicados en el desarrollo del carpelo, cuajado normal del fruto y cuajado partenocárpico del fruto.

## **7. Caracterización de una F2 segregante para la partenocarpia de RP75/59**

Con objeto de obtener una población segregante que permitiera realizar el cartografiado de los genes responsables de la partenocarpia en la línea RP75/59 se desarrolló una F2 entre esta línea y la variedad no partenocárpica UC82.

Se caracterizaron 142 plantas de la F2, la F1 y los parentales. Las plantas se cultivaron a dos guías: una guía se empleó para evaluar la capacidad de cuajado partenocárpico y la otra para evaluar la capacidad de cuajado tras polinizar. Se caracterizaron cuatro ramilletes por guía y tres flores por ramillete con objeto de evitar fenómenos de competencia entre frutos. Se tomaron datos de todos los frutos cuajados.

La gran mayoría de frutos se recogieron en el estadio de viraje y rojo maduro, cuatro meses después de realizar los últimos cruces se recogieron el resto de frutos, aunque no hubieran sido capaces de madurar. Para caracterizar los frutos se tomaron datos de peso, diámetro máximo, altura (distancia entre el peciolo y la base del fruto), presencia de semillas o pseudoembriones, desarrollo de los lóculos y formación de tejido locular. A partir de estos datos se calculó para cada una de las plantas en cada guía el porcentaje de frutos cuajados y de los distintos tipos de frutos, el peso, diámetro y altura media del fruto. Para agrupar las distintas plantas se realizó un análisis de componentes principales a partir de los datos de la guía empleada para evaluar la partenocarpia. Los análisis de componentes principales se realizaron con el programa Ginkgo (Bouxin, 2005), estandarizando las variables.

También se realizó una caracterización de la expresión génica en 16 plantas de la F2, la F1 y los parentales. Para ello se caracterizó el nivel de expresión de 11 genes, seleccionados a partir de los análisis realizados con el Affymetix GeneChip Tomato Genome Array. La expresión génica se caracterizó en flores durante el estadio de anthesis. Para agrupar las distintas plantas se realizó un análisis de componentes principales a partir de los datos de nivel de expresión génica.

Se han propuesto dos modelos genéticos diferentes para explicar la herencia de la partenocarpia de la línea RP75/59 (Nuez *et al*, 1986,1988; Philouze, 1989; Vardy *et al*, 1989a). Para determinar que modelo genético se ajusta más a nuestros datos de segregación se realizó un test  $\chi^2$  para cada modelo.



## **IV. RESULTADOS**



## 1. Identificación de genes implicados en el cuajado del fruto en tomate y *Arabidopsis*

El estudio del cuajado del fruto es el primer paso para mejorar la producción de muchos cultivos vegetales. Para entender mejor este proceso se realizó una búsqueda de genes implicados en el cuajado en dicotiledóneas empleando las especies modelo tomate y *Arabidopsis*. Para ello se usaron dos aproximaciones. En tomate se empleó la técnica de sustracción de genotecas, para crear una subgenoteca enriquecida en genes presentes tras la fecundación que no estuvieran expresándose durante la antesis. En *Arabidopsis*, mediante el estudio de los datos de hibridaciones de microarrays del experimento AtGenExpress, se aislaron genes regulados durante el cuajado. Para determinar el grado de conservación de los genes entre ambas especies se comparó la expresión génica de los genes aislados mediante los dos procedimientos. Además, se realizó un estudio funcional de los genes para detectar las distintas funciones biológicas implicadas en el cuajado (Pascual *et al*, 2007) (Anexo 1).

### 1.1 Búsqueda de genes implicados en el cuajado del fruto en tomate

Para estudiar el cuajado del fruto en tomate se empleó la variedad UC82. Esta variedad presentó un porcentaje de cuajado superior al 95% en condiciones de invernadero y polinizando manualmente las flores. Esto permitió estudiar los estadios tempranos del desarrollo sin necesidad de esperar a que se diera un aumento en el tamaño del carpelo que confirmara el cuajado.

El cuajado se puede definir como el momento exacto en que se produce la reanudación de la división celular en el ovario tras la polinización. Este momento exacto se determinó, mediante PCR a tiempo real, analizando la expresión de un marcador de división celular, el gen PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). Se caracterizó el nivel de expresión del PCNA en: flores en antesis y tras la antesis a intervalos de 24 horas hasta 7DPA, momento en el cual el aumento de tamaño del carpelo era evidente a simple vista. Se detectó un aumento significativo en el nivel de expresión del gen marcador de proliferación celular a 3DPA, aproximadamente 72 horas después de la antesis. Por ello, el estadio 3DPA se seleccionó como el momento del cuajado en esta variedad en las condiciones de cultivo empleadas.

## Resultados

Una vez determinado el momento del cuajado en tomate (3DPA), para detectar genes implicados, se desarrolló una genoteca de sustracción de ADNc utilizando flor completa en los estadios de 3DPA y antesis. Tras sintetizar el ADNc a partir de ARNm procedente de los dos estadios, mediante la técnica de sustracción de genotecas, se construyó una genoteca enriquecida en genes que se expresan más en el estadio de 3DPA que en el de antesis. Se analizaron 252 clones independientes. Estos clones se secuenciaron y las secuencias obtenidas se ensamblaron en 181 contigs. Estas secuencias han sido depositadas en la EMBL Nucleotide Sequence Database, con los códigos entre AM495471 y AM495722. Se obtuvieron: 4 contigs formados por al menos 5 clones diferentes, 10 formados por 3 clones, 27 por sólo 2 clones y el resto de clones no se agruparon con ningún otro. A priori, se consideró que únicamente los contigs formados por dos clones o más corresponderían a genes sobre-expresados durante el cuajado con respecto a la antesis. A partir del consenso de los contigs se realizó un BLAST contra la base de datos de secuencias de tomate del TIGR (LGI\_091806), se identificó el gen correspondiente a la mayoría de los contigs (Tabla 3 y Anexo 2). Por lo que para análisis posteriores se empleó la secuencia del TIGR, que en la mayoría de los casos era de mayor longitud.

**Tabla 3.** Contigs obtenidos a partir de la secuencia de los clones de la genoteca ordenados por número de clones. Contiene los contigs formados por más de dos clones o cuya expresión se analizó mediante PCR a tiempo real, sean o no diferenciales.

Contig	Clones	Código TIGR	Anotación según el TIGR
B_E11	10	*TC180501	UPIQ7M222_LYCES (Q7M222) Probable proteinase inhibitor precursor, partial (92%)
D_H11	7	TC187752	Homologue to gblAF036490,1  Acorus gramineus large subunit 26S ribosomal RNA gene, partial (13%)
E_E11	6	AW040934	H3 histone H3R-11 {Oryza sativa} EGAD 131482 140407
E_G04	5	TC170348	UPIIP22_LYCES (Q43710) Proteinase inhibitor type-2 TR8 precursor (Proteinase inhibitor type II TR8), complete
B_C11	3	TC187973	Homologue to UPIQ9ZR68_TOBAC (Q9ZR68) Aquaporin 1, partial (58%)
D_C05	3	TC170294	UPIMETM_LYCES (P43282) S-adenosylmethionine synthetase 3 (Methionine adenosyltransferase 3) (AdoMet synthetase 3), complete

**Tabla 3.** Contigs obtenidos a partir de la secuencia de los clones de la genoteca (cont.).

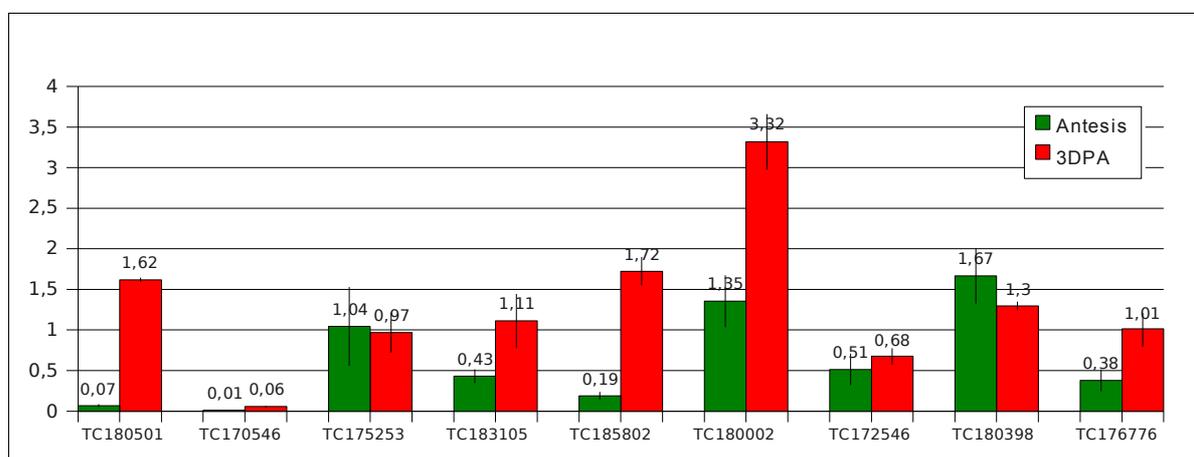
Contig	Clones	Código TIGR	Anotación según el TIGR
C_G01	3	TC183252	UPIRL38_LYCES (P46291) 60S ribosomal protein L38, complete
D_H05	3	AA824870	Homologue to GBIDQ191669,1 Solanum tuberosum ribosomal protein S6-like protein mRNA
B_H06	3	TC170179	Similar to UPIRL18_ARATH (P42791) 60S ribosomal protein L18, complete
E_G02	3	TC189949	Similar to UPIQ5W1I1_NICGL(Q5W1I1) Putative ML domain protein (Fragment)
A_F02	3	*TC170549	UPISYST_LYCES (P27058) Systemin precursor, complete
A_F12	3	*TC175253	Homologue to UPIQ2V9A7_SOLTU (Q2V9A7) Cyclophilin ROC7-like, partial (97%)
B_E01	3	*TC183105	Homologue to UPIQ45TE3_TOBAC (Q45TE3) Senescence-associated protein, partial (34%)
A_A06	3	*TC185802	Similar to UPIQ38806_ARATH (Q38806) AtHSP22,0 precursor (Heat shock protein 22,0), partial (51%)
D_B08	2	TC172422	Weakly similar to UPIQ9SW12_ARATH (Q9SW12) Acid phosphatase-like protein, partial (41%)
D_C06	2	TC189707	Homologue to UPIQ9XE59_SOLTU (Q9XE59) Phosphoglycerate mutase, partial (17%)
D_B10	2	TC175597	Similar to UPIQ8L934_ARATH (Q8L934) Nucleoid DNA-binding-like protein, partial (47%)
D_G11	2	TC189813	Similar to UPIQ2HVE6_MEDTR (Q2HVE6) Zinc finger, C2H2-type, partial (12%)
E_D09	2	BG129307	Extensin-like protein {Solanum tuberosum} PIRIT071761 T07176 extensin homologue-potato (fragment)
E_F04	2	TC176996	Homologue to UPIB2_DAUCA, B2 protein, partial (71%)
A_A02	2	TC169901	UPIQ8VWL8_LYCES (Q8VWL8) Beta-mannosidase enzyme, complete
A_E01	2	TC174179	Similar to UPIQ6YCG3_VITVI (Q6YCG3) Wound-induced protein-like (Fragment), partial (31%)
E_C08	2	TC177353	Similar to UPIQ94G86_OLEEU (Q94G86) Beta-1,3-glucanase-like protein, partial (32%)
E_D05	2	TC172590	Similar to RFINP_916542,1134910390INM_191653 ribosomal protein L28-like {Oryza sativa}partial (98%)
A_E10	2	TC177340	Similar to UPIQ9VGW5_DROME (Q9VGW5) CG14687-PA (RE74890p), partial (12%)

**Tabla 3.** Contigs obtenidos a partir de la secuencia de los clones de la genoteca (cont.).

Contig	Clones	Código TIGR	Anotación según el TIGR
B_B12	2	TC171658	Homologue to UPIQ307Z5_SOLTU (Q307Z5) Deacetylase-like protein, complete
B_C04	2	TC179011	Similar to RFINP_195169,3 30690036 NM_119608 ATSWI3C; DNA binding {Arabidopsis thaliana}, partial (5%)
A_E02	2	TC170474	Homologue to UPIQ308A0_SOLTU (Q308A0) P40-like protein, partial (89%)
A_G07	2	TC169927	UPIQ8GT67_LYCES (Q8GT67) Xyloglucan-specific fungal endoglucanase inhibitor protein, complete
B_A11	2	TC170047	Homologue to UPIQ8GT37_SOLTU (Q8GT37) Tuber-induction protein (Fragment), partial (9%)
B_B06	2	TC170987	Similar to UPIQ94BU8_ARATH (Q94BU8) AT5g28050/F15F15_120, partial (97%)
B_F05	2	BI210647	Similar to GPI5579094 gb AAD45425,1  gibberellin 2-oxidase {Pisum sativum}, partial (17%)
B_H08	2	TC174895	Homologue to UPIQ33W67_9GAMM(Q33W67) Flagellar FliF M-ring protein
D_A06	2	TC184407	Similar to UPIQ2P9V0_9MAGN (Q2P9V0) Soluble inorganic pyrophosphatase, partial (82%)
D_A09	2	TC177701	Similar to UPIQ40380_NICAL (Q40380) Arabinogalactan-protein precursor, partial (83%)
B_F11	2	DV105017	Similar to ubiquitin conjugating enzyme E2, mRNA
F_F11	2	TC172378	Homologue to UPIH2B_GOSHI (O22582) Histone H2B, partial (96%)
B_G11	2	TC189580	UPIQ9M5A8_LYCES (Q9M5A8) Chaperonin 21 precursor
F_E10	2	TC183832	gb U82638,1 NTU82638 Nicotiana tabacum small subunit ribosomal RNA gene, mitochondrial gene for mitochondrial RNA, complete sequence, partial (64%)
B_G10	2	*TC180002	Homologue to UPIQ948Z4_SOLTU (Q948Z4) Snakin-1, complete
F_B09	2	*TC172546	Weakly similar to GB AAM66090,1 21595314 AY088558 cold acclimation protein WCOR413-like protein {Arabidopsis thaliana}, partial (92%)
E_D04	1	*TC180398	Weakly similar to MTN3 homolog, partial (71%)
F_C11	1	*TC176776	Similar to GB AAK63976,1 14532496 AY039872 At1g80180/F18B13_26 {Arabidopsis thaliana}, partial (46%)

\*Genes probados por PCR cuantitativa a tiempo real.

Mediante la técnica de sustracción de genotecas se pretendía conseguir una genoteca enriquecida en genes con mayor nivel de expresión a 3DPA, sin embargo la sustracción nunca es efectiva al 100%, y la genoteca también contiene genes con nivel de expresión similar en los dos estadios empleados para su construcción (3DPA y antesis). Para determinar la eficacia de la sustracción y comprobar si realmente se obtuvo una genoteca enriquecida en genes más expresados durante el cuajado (3DPA), se analizó la expresión de algunos genes mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Figura 14). Se seleccionaron nueve genes correspondientes a contigs representados por entre 10 y 1 clon. La expresión de los genes se consideró diferente cuando tras normalizar empleando la actina como gen de referencia la expresión a 3DPA fue al menos dos veces superior a la de la antesis.



**Figura 14.** Expresión de los genes obtenidos en la sustracción, a 3DPA y antesis, normalizada frente a la actina. Los genes están ordenados por número de clones.

Se expresaban diferencialmente: el gen representado por 10 clones, tres de los cuatro genes representados por 3 clones, uno de los dos genes representados por 2 clones y uno de los 2 genes representados únicamente por un clon. En total se confirmó la expresión diferencial de 6 de los 9 genes analizados. Este resultado demostró la eficacia de la sustracción, y que algunos de los contigs representados por un único clon, que en principio no se habían considerado como genes diferenciales, también estaban sobre-expresados durante el cuajado.

### 1.2 Búsqueda de genes implicados en el cuajado y desarrollo temprano del fruto en *Arabidopsis*

Los genes implicados en el cuajado del fruto en *Arabidopsis* se identificaron analizando el transcriptoma a partir de los datos del proyecto AtGenExpress (Schmid *et al*, 2005). Este proyecto pretende proporcionar un atlas de la expresión génica en la especie modelo *Arabidopsis*, contiene datos de más de 70 hibridaciones del microarray ATH1 de Affymetrix. Las hibridaciones se han realizado a partir de diferentes tejidos en distintos estadios de desarrollo. Los datos ya normalizados están disponibles en la base de datos AtGenExpress (<http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress>). Para aislar genes regulados durante el cuajado del fruto, de todas las muestras analizadas en este proyecto, se seleccionaron las que representan el transcriptoma del carpelo entre pre-antesis y 4-5 DPA (Atge\_37, Atge\_45 y Atge\_76). Atge\_37 contiene los resultados de la hibridación de ARNm de carpelos en el estadio 12 (pre-antesis), Atge\_45 corresponde a carpelos en el estadio 15 (el momento de la fecundación) y Atge\_76 son silicuas en el estadio 3 (el más temprano de los de desarrollo del fruto presente en el proyecto AtGenExpress).

Los genes expresados diferencialmente se identificaron mediante un análisis SAM (Microarray Significant analysis), realizando comparaciones dos a dos entre los tres estadios seleccionados. Además de los requerimientos estadísticos, para marcar un gen como diferencial, se exigieron unas diferencias de nivel de expresión entre estadios superiores a 2 (una expresión cuatro veces mayor puesto que trabajamos en escala log<sub>2</sub>) (Tabla 4). Tras juntar los datos de las tres comparaciones y eliminar los genes duplicados se identificaron 1879 genes regulados durante el proceso, el 8,3% de los genes representados en el microarray (Anexo 2). Entre el estadio de pre-antesis y el de fecundación (SAM 1) había un 2% de genes sobre-expresados y menos de un 1% de genes sub-expresados. Entre carpelos en el momento de la fecundación y silicuas 4-5 DPA se detectaron un 3% de genes sobre-expresados y un 2% sub-expresados. Por último, al comparar carpelos en pre-antesis y silicuas se encontraron un 5% de genes sobre-expresados y un 3% sub-expresados.

**Tabla 4.** Resumen del análisis SAM.

<b>Análisis</b>	<b>SAM 1</b>	<b>SAM 2</b>	<b>SAM 3</b>
Grupo A	Atge_37	Atge_45	Atge_37
Grupo B	Atge_45	Atge_76	Atge_76
Genes significativamente positivos	398	632	1180
Genes significativamente negativos	116	406	645
Genes no significativos	22296	21769	20985
Diferencias de expresión mínimas	4	4	4
$\Delta$	3	1,99	1,55
Nº de falsos significativos (90%)	1,59	0,98	0,49

### 1.3 Comparación de la expresión génica en tomate y *Arabidopsis*

Antes de determinar el grado de conservación de la expresión génica en tomate y *Arabidopsis* a lo largo del cuajado, fue necesario identificar las relaciones de ortología entre los genes de ambas especies. La asignación de ortólogos se realizó mediante la estrategia de BLAST cruzado entre la base de datos de *Arabidopsis* TAIR 6 y la base de datos de tomate del TIGR (LeGI11.0). Los genes se consideraron ortólogos cuando en el BLAST de tomate contra *Arabidopsis* y en el BLAST de *Arabidopsis* contra tomate el primer resultado fue recíproco, es decir, el primer resultado de un BLAST era la secuencia problema del otro y viceversa. De esta manera se determinaron 7216 ortólogos en tomate, el 32% de los genes de *Arabidopsis* representados en el microarray.

#### *1.3.1 Conservación entre tomate y Arabidopsis*

Cuando se estudiaron los genes identificados mediante el experimento de sustracción de genotecas, de los 181 contigs obtenidos, 32 tenían un ortólogo claro en *Arabidopsis* que estaba representado en el microarray (Anexo 2). Muchos de ellos correspondían a contigs formados por un único clon. Al analizar la expresión de estos genes en *Arabidopsis* en los estadios de carpelo en pre-antesis, carpelo durante la fecundación y silicua 4-5 DPA, se comprobó que 8 de los 32 genes con ortólogo también se expresaban diferencialmente en *Arabidopsis*. Esto supone un 25%

## Resultados

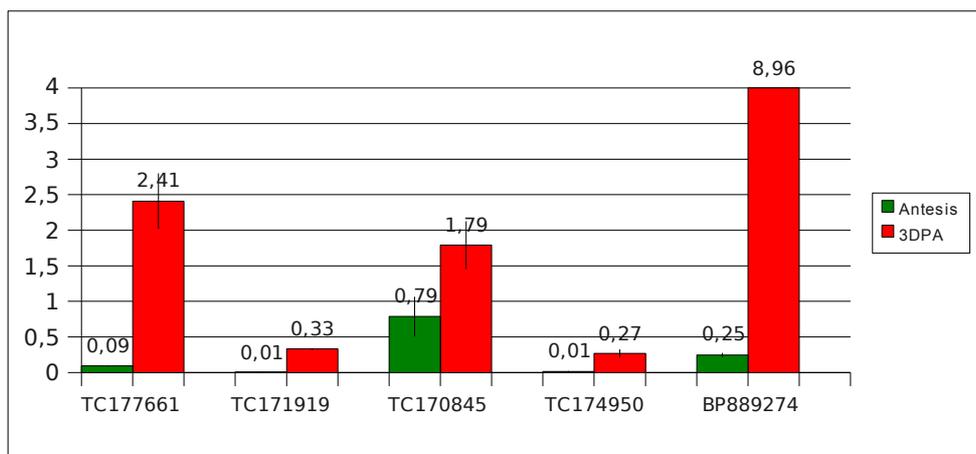
de los genes de la genoteca, porcentaje similar al de enriquecimiento en genes diferenciales de las genotecas desarrolladas mediante la técnica de sustracción.

De los ocho genes diferencialmente expresados en *Arabidopsis* uno, TC180002 estaba representado por dos clones en la genoteca, por lo que, se consideró diferencialmente expresado. Además, su expresión en tomate había sido comprobada mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Figura 14). El resto de genes (Tabla 5) estaban representados por un único clon y en principio no se habían considerado diferenciales. Por ello, para determinar la correlación entre tomate y *Arabidopsis*, se comprobó la expresión de estos genes en tomate. De las siete parejas de cebadores diseñadas dos no funcionaron correctamente, finalmente se analizó la expresión de 5 genes y se observó que todos estaban sobre-expresados a 3DPA con respecto a antesis. Cuatro presentaron un nivel de expresión más de cuatro veces superior a 3DPA, y el otro entre 2 y 4 veces mayor a 3DPA (Figura 15).

**Tabla 5.** Genes representados por un único clon cuyo ortólogo se expresa diferencialmente en *Arabidopsis*.

Contig	Código TIGR	Ortólogo de <i>Arabidopsis</i>	Anotación según el TIGR
A_D05	*TC177661	AT2G34700	Weakly similar to UPIQ6QNA3_CAPAN (Q6QNA3) Proline-rich protein 1, partial (48%)
C_C02	*TC171919	AT4G35770	Similar to UPIQ45TE3_TOBAC (Q45TE3) Senescence-associated protein, partial (83%)
E_E05	*TC170845	AT5G06860	UPIQ40160_LYCES (Q40160) Polygalacturonase inhibitor protein precursor, complete
F_G01	*TC174950	AT1G18250	Similar to UPI_TLPH_ARATH (P50699) Thaumatin-like protein precursor, partial (93%)
D_C11	*BP892749	AT1G54050	Homologue to gblAF399821,1 Lycopersicon peruvianum small heat stress protein class III
A_F06	TC171720	AT3G24500	UPIQ9SWW1_LYCES (Q9SWW1) Ethylene-responsive transcriptional coactivator, complete
F_C02	TC173524	AT3G07820	similar to UPI_PGLR_TOBAC (Q05967) Polygalacturonase precursor (PG) (Pectinase), partial (96%)

\* Genes probados por PCR a tiempo real.



**Figura 15.** Expresión de los genes obtenidos en la sustracción a 3DPA y antesis, normalizada frente a la actina.

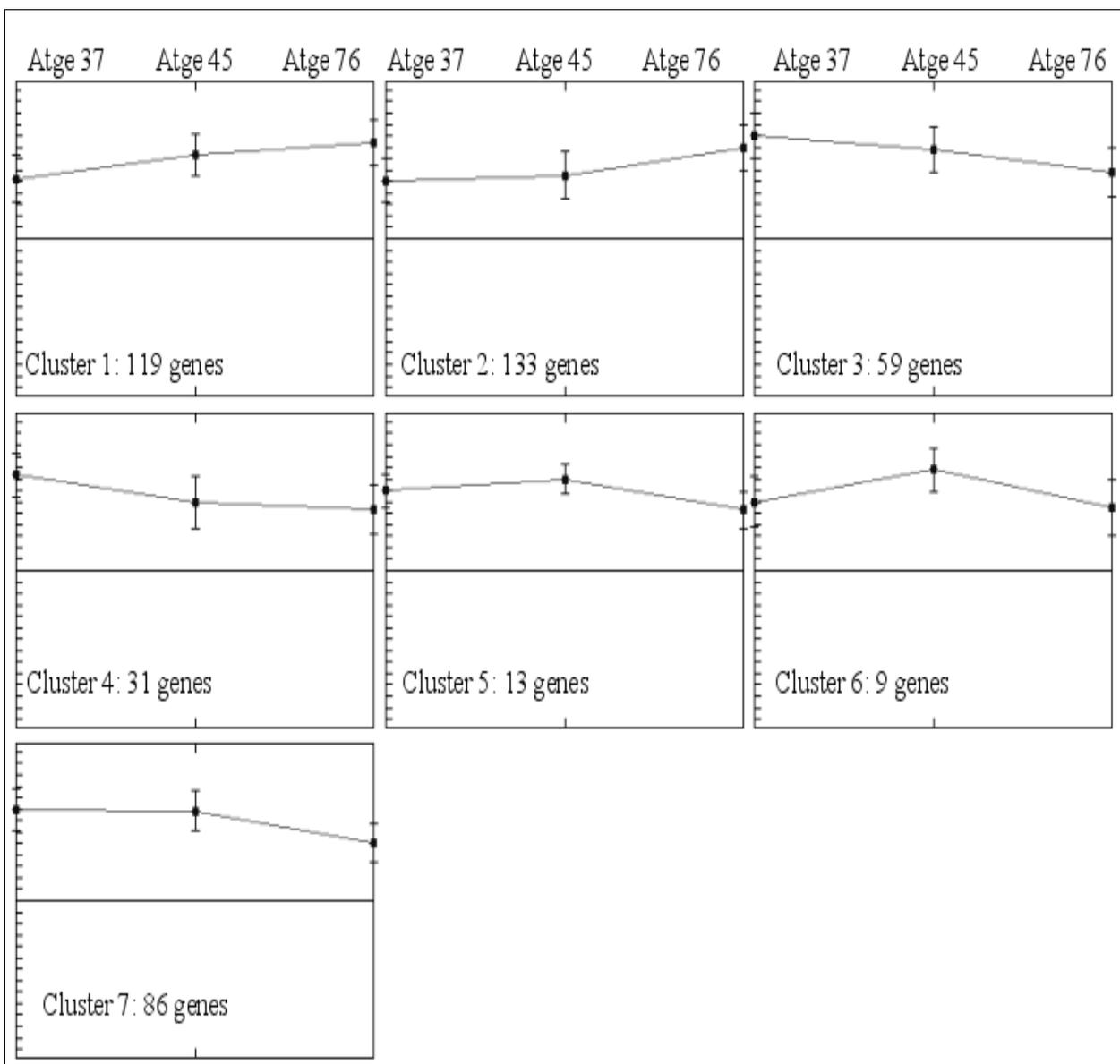
### 1.3.2 Conservación entre *Arabidopsis* y tomate

De los genes diferenciales aislados a partir de los datos del microarray de *Arabidopsis* un 24% tenía ortólogo en tomate (Anexo 3). Con objeto de comprobar si los 450 genes con ortólogo se expresaban diferencialmente en el carpelo de tomate durante el cuajado, se analizó en esta especie la expresión de un conjunto de genes representativo mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Para seleccionar los genes cuya expresión iba a ser comprobada en tomate, primero se agruparon los genes de *Arabidopsis* en función de su patrón de expresión. Luego se seleccionaron genes al azar dentro de cada uno de los grupos, de manera que, en nuestro análisis se incluyeron genes que representaban los diversos patrones de expresión existentes en *Arabidopsis*.

Cuando se realizó el análisis cluster en función del nivel de expresión para agrupar los genes de *Arabidopsis* estos se separaron en siete clusters diferentes (Figura 16). El cluster 1 estaba formado por 119 genes cuya expresión aumentó desde el estadio 12 de carpelo (Atge\_37) hasta el estadio 3 de silicua (Atge\_76). El cluster 2 incluyó 133 genes cuya expresión sufrió un ligero aumento entre el estadio 12 y 15 de carpelo (Atge\_45) y un aumento mayor entre éste y el estadio 3 de silicua. El cluster 3 agrupó 59 genes cuya expresión decreció entre el estadio 12 y el

## Resultados

estadio 3 de silicua. El cluster 4 incluyó 31 genes con un patrón de expresión similar al del cluster tres pero un descenso mayor entre el estadio 12 y el 15. Los clusters 4 y 5 agruparon 13 y 9 genes respectivamente, incluyendo genes con un pico en el nivel de expresión durante el estadio 15 del carpelo. Por último, el cluster 7 agrupó 86 genes cuya expresión permaneció prácticamente constante entre el estadio 12 y 15 del carpelo y decreció hasta llegar al estadio 3 de silicua.



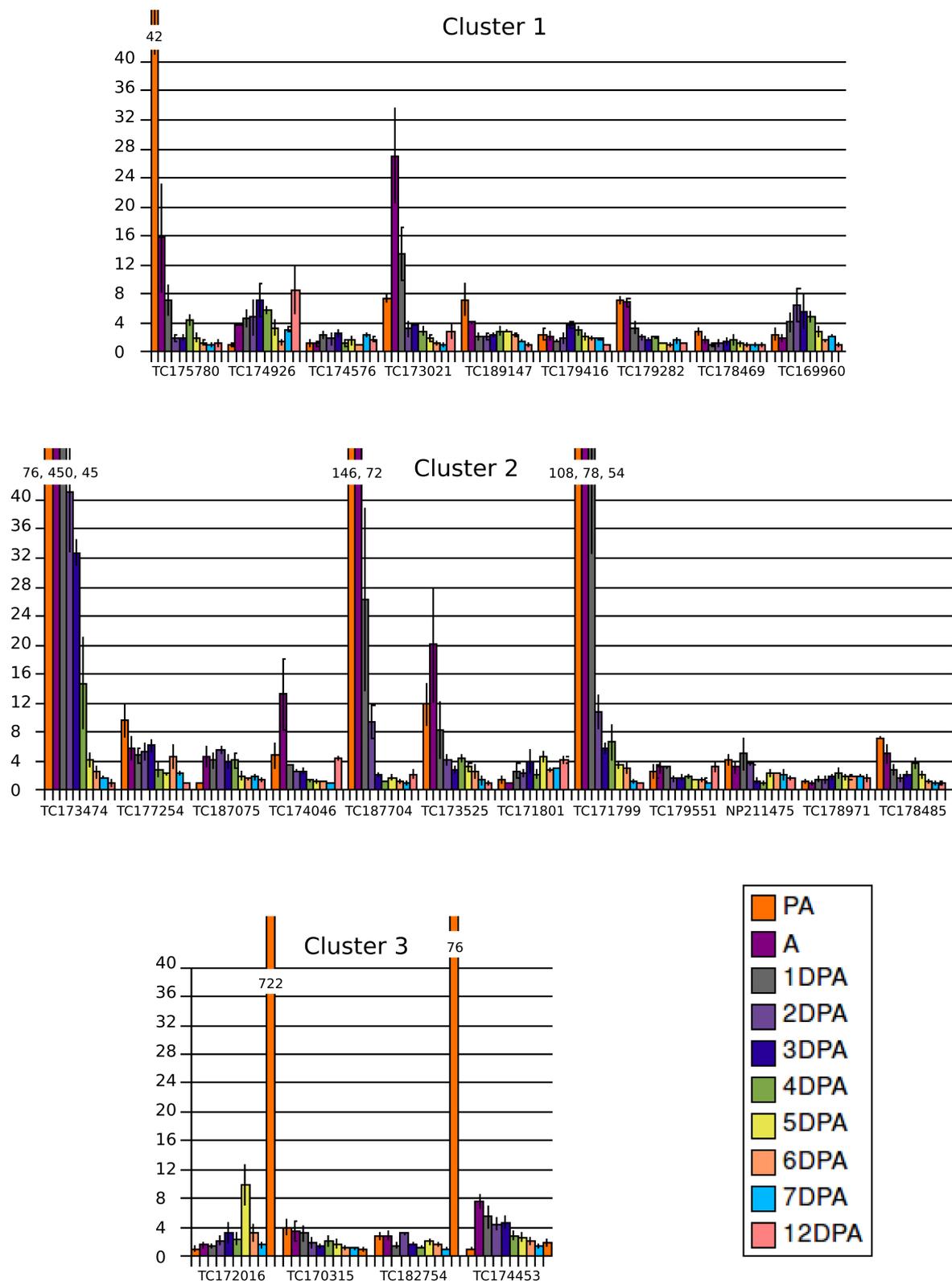
**Figura 16.** Tendencia de los patrones de expresión de los genes expresados diferencialmente en *Arabidopsis* con ortólogo en tomate.

A partir del análisis cluster, se seleccionaron al azar un 10% de los genes de cada cluster y se comprobó la expresión de estos genes en tomate. De todos los genes seleccionados 37 de las parejas de cebadores funcionaron correctamente en tomate, es decir, dieron un nivel de expresión cuantificable y amplificaron un único producto de PCR. La expresión de estos genes en tomate se caracterizó en carpelos en: pre-antesis, antesis y a intervalos de 1 día hasta 7 DPA y a 12 DPA. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a la actina, en cada uno de los estadios analizados, y con respecto al menor nivel de expresión, a lo largo de los distintos estadios en cada uno de los genes. Siguiendo el criterio empleado en el análisis SAM, los genes se consideraron diferencialmente expresados cuando existía una diferencia en el nivel de expresión de al menos 4 veces entre alguno de los estadios analizados y el estadio con menor nivel de expresión.

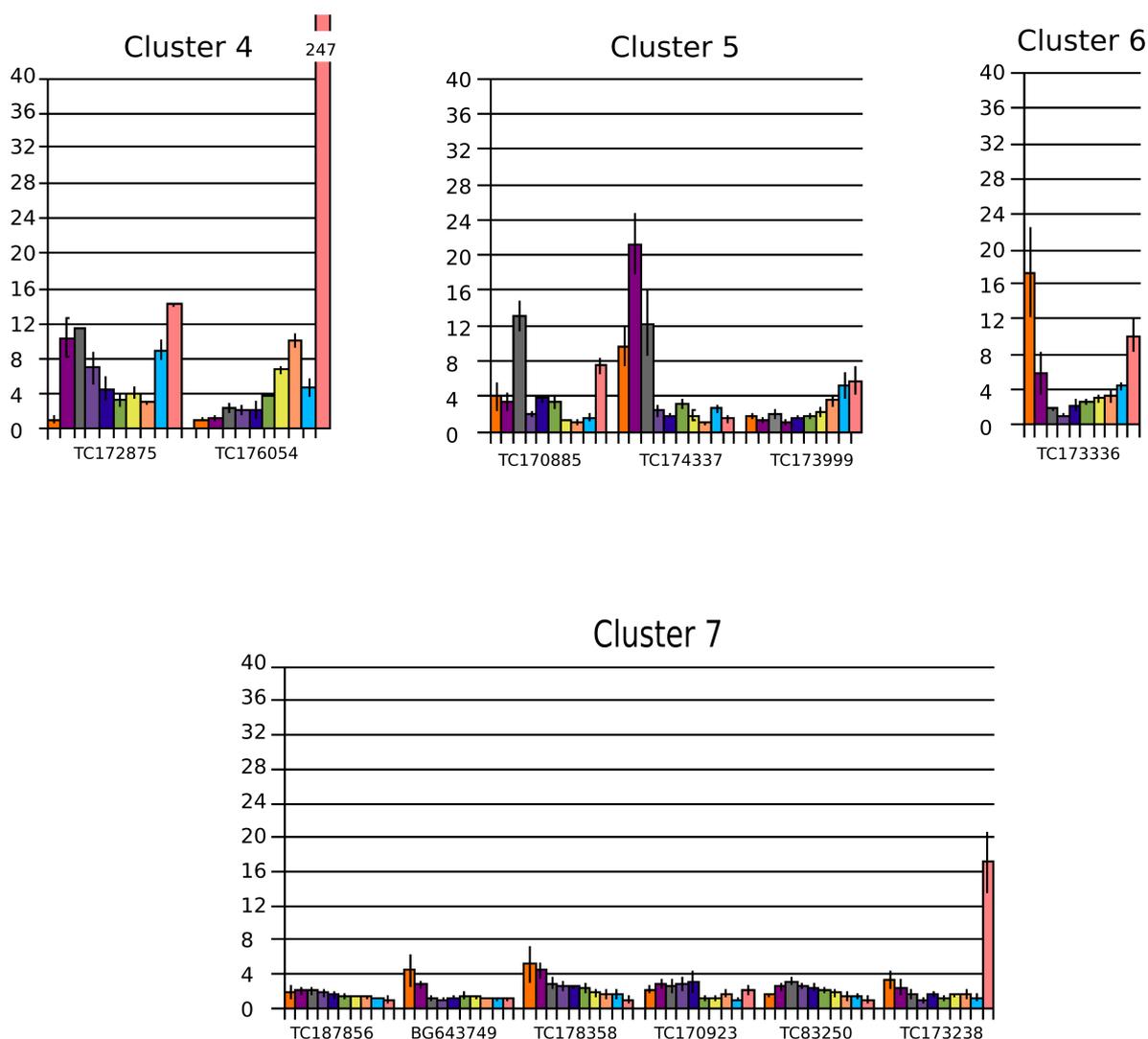
La figura 17 muestra el patrón de expresión de los 37 genes analizados en tomate. De los 119 genes que conforman el cluster 1 se analizaron 9, detectándose 6 diferencialmente expresados en tomate. De los 133 genes del cluster 2 se probaron 12, y 10 se expresaron diferencialmente. De los 59 genes del cluster 3 se analizaron 4, y todos ellos resultaron diferenciales. De los 31 genes del cluster 4 se probaron 2, también eran diferenciales en tomate. De los 13 y 9 genes de los clusters 5 y 6 se analizaron respectivamente 3 y 1 genes, todos ellos expresados diferencialmente. Por último, de los 86 genes del cluster 7 se probaron 6, tres de los cuales se expresaban diferencialmente en tomate.

En total, de los 37 genes analizados, 29 se expresaban diferencialmente en tomate (Figura 17). Estos 29 genes presentaban patrones de expresión diversos, algunos estaban sobre-expresados durante la pre-antesis y la antesis, otros durante los últimos estadios, y otros presentaban un pico de expresión en los estadios intermedios. A pesar del alto grado de conservación entre *Arabidopsis* y tomate (el 78% de los genes expresados diferencialmente en *Arabidopsis* también están regulados en tomate) no se detectó ninguna correlación entre los patrones de expresión de los clusters de *Arabidopsis* y los patrones de expresión de los genes en tomate.

Resultados



**Figura 17.** Expresión de los genes cuantificada mediante PCR cuantitativa a tiempo real en carpelos de tomate.

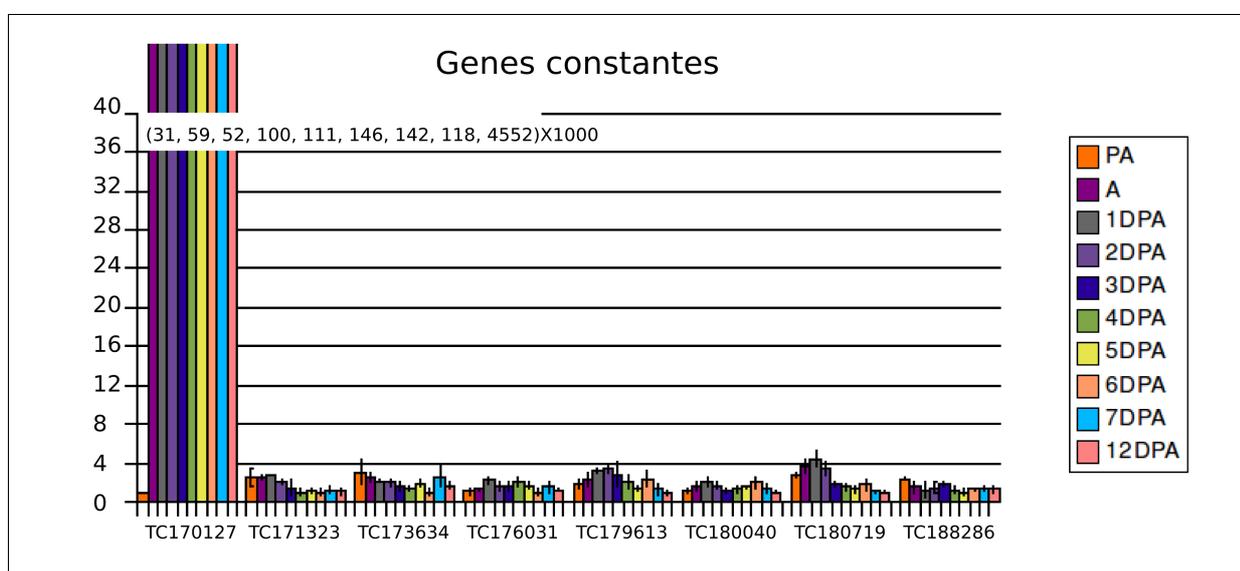


**Figura 17.** Expresión de los genes cuantificada mediante PCR cuantitativa a tiempo real en carpelos de tomate (cont.).

Para determinar la eficacia del método de comparación se estudió el grado de correlación entre *Arabidopsis* y tomate entre los genes con expresión constante. Se consideraron constantes los genes cuya expresión a lo largo del cuajado y desarrollo temprano del fruto (carpelos en estadio 12, carpelos en estadio 15 y silicuas en estadio 3, 4, 5) no variaba más de 0,5 veces y presentaban diferencias de expresión de al menos 4 veces entre alguna de las otras muestras caracterizadas en el proyecto AtGenExpress. De esta manera se aislaron 704 genes constantes a lo largo del cuajado del fruto en *Arabidopsis*, de los 7216 con ortólogo en tomate. Se

## Resultados

seleccionaron 8 genes al azar, y se caracterizó su expresión en carpelos de tomate en: pre-antesis, antesis, a intervalos de 1 día hasta 7 DPA y a 12 DPA (Figura 18). Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a la actina, en cada uno de los estadios analizados, y con respecto al menor nivel de expresión, a lo largo de los distintos estadios, en cada uno de los genes. De los 8 genes analizados, 6 eran también constantes a lo largo del cuajado y desarrollo temprano del fruto en tomate, y dos mostraban diferencias significativas en el nivel de expresión. El porcentaje de conservación entre ambas especies fue del 75%, similar al observado cuando trabajamos con genes diferenciales.



**Figura 18.** Expresión de los genes constantes cuantificada mediante PCR cuantitativa a tiempo real en carpelos de tomate.

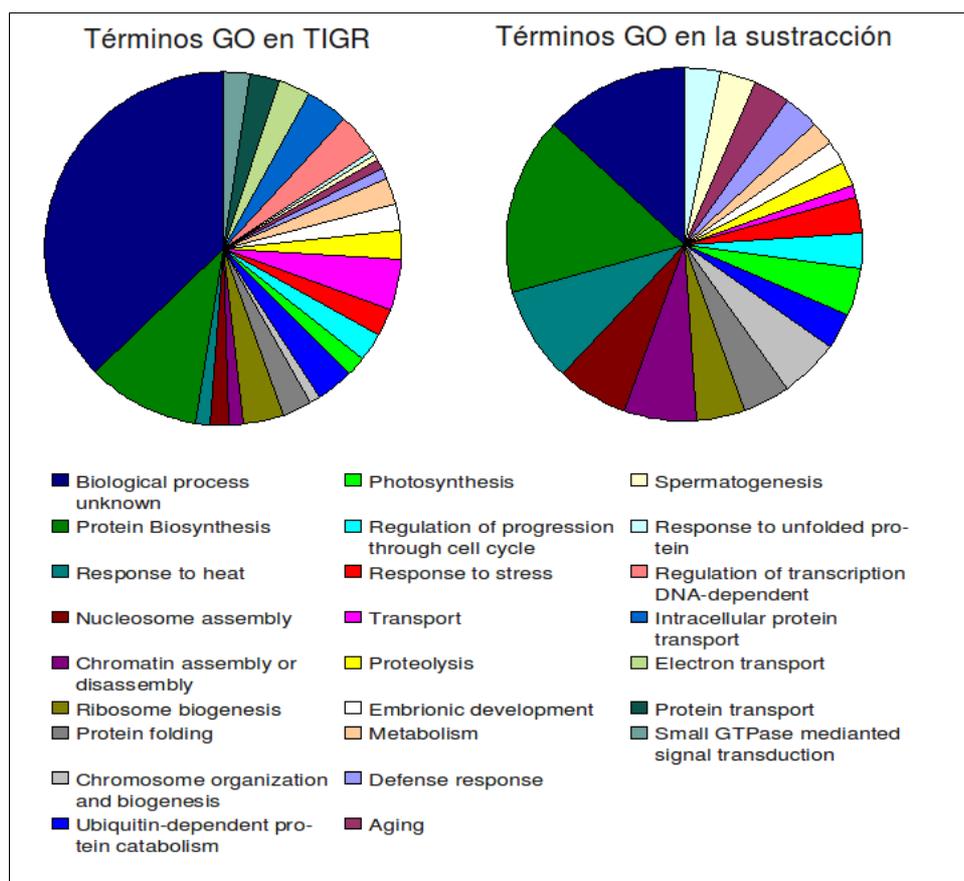
En total se habían aislado 450 genes diferenciales en *Arabidopsis* con ortólogo en tomate, de estos se espera que alrededor del 78% sean realmente diferenciales en tomate, lo que supone, 338 genes diferencialmente expresados en el carpelo a lo largo del cuajado del fruto en tomate. Además, este número se irá incrementando conforme avance el proyecto de secuenciación de tomate y aumente el número de secuencias disponibles, lo que permitirá identificar un mayor número de ortólogos entre ambas especies.

### 1.4 Análisis funcional del cuajado del fruto

El análisis funcional de los genes aislados se realizó a partir de los datos de anotación de términos GO (Gene Ontology) del TIGR, en el caso de tomate, y empleando el Babelomics (Al-Shahrour *et al*, 2006), en el caso de *Arabidopsis*.

#### 1.4.1 Análisis funcional de los genes aislados en tomate mediante sustracción de genotecas

Se analizaron los porcentajes de los distintos términos GO en todos los genes anotados de la base de datos de tomate, y en los 181 genes aislados mediante la sustracción de genotecas (Figura 19). De esta manera se determinaron los procesos biológicos especialmente representados en los genes sobre-expresados durante el cuajado del fruto en tomate.



**Figura 19.** Porcentajes de los 16 términos GO referidos a procesos biológicos más representados en la base de datos de tomate del TIGR y en la genoteca.

## Resultados

Se detectó un enriquecimiento en la genoteca de los genes relacionados con: biosíntesis de proteínas, ensamblaje de nucleosomas, histonas, ensamblaje y desensamblaje de la cromatina, organización de los cromosomas, respuestas de defensa, respuestas al calor, ciclo celular, fotosíntesis, espermatogénesis y envejecimiento. También se detectó un empobrecimiento en genes relacionados con: transporte, regulación de la transcripción ADN dependiente, transporte intracelular de proteínas, transporte de electrones, transporte de proteínas y transducción de señales mediada por GTPasas.

### 1.4.2 Análisis funcional de los genes expresados diferencialmente en *Arabidopsis*

El análisis funcional de los genes aislados a partir de los datos de *Arabidopsis* se realizó con el programa FatiGO (Al-Shahrour *et al*, 2004), este programa es capaz de extraer los términos GO significativamente sobre o sub-representados en un grupo de genes con respecto a un grupo de referencia mediante la aplicación de un test de Fisher. Con este procedimiento se identificaron los términos GO sobre y sub-representados en los genes diferencialmente expresados durante el cuajado del fruto de *Arabidopsis*, según el análisis SAM, con respecto a el resto de genes presentes en el microarray (Tabla 6).

**Tabla 7.** Comparación de los términos GO de los genes con ortólogo referidos a proceso biológico con el programa FatiGO.

Proceso biológico	Ortólogos Microarray	Ortológicos diferenciales	Adj. pvalor	Nivel
Response to temperature stimulus	0,90%	5,29%	4,97E-003	4
Regulation of transcription, DNA-dependent	15,22%	35,36%	6,98E-003	8
Protein biosynthesis	7,83%	0,65%	1,62E-002	6
Response to oxidative stress	0,90%	4,33%	3,35E-002	4
Response to pest, pathogen or parasite	2,20%	6,73%	4,73E-002	4

Los términos GO sobre-representados incluían genes relacionados con la respuesta a diversos estímulos como: ácido giberélico, auxinas, ácido jasmónico, ácido salicílico y ácido abscísico, respuesta a calor, respuesta a desecación, modificación de la pared celular, regulación

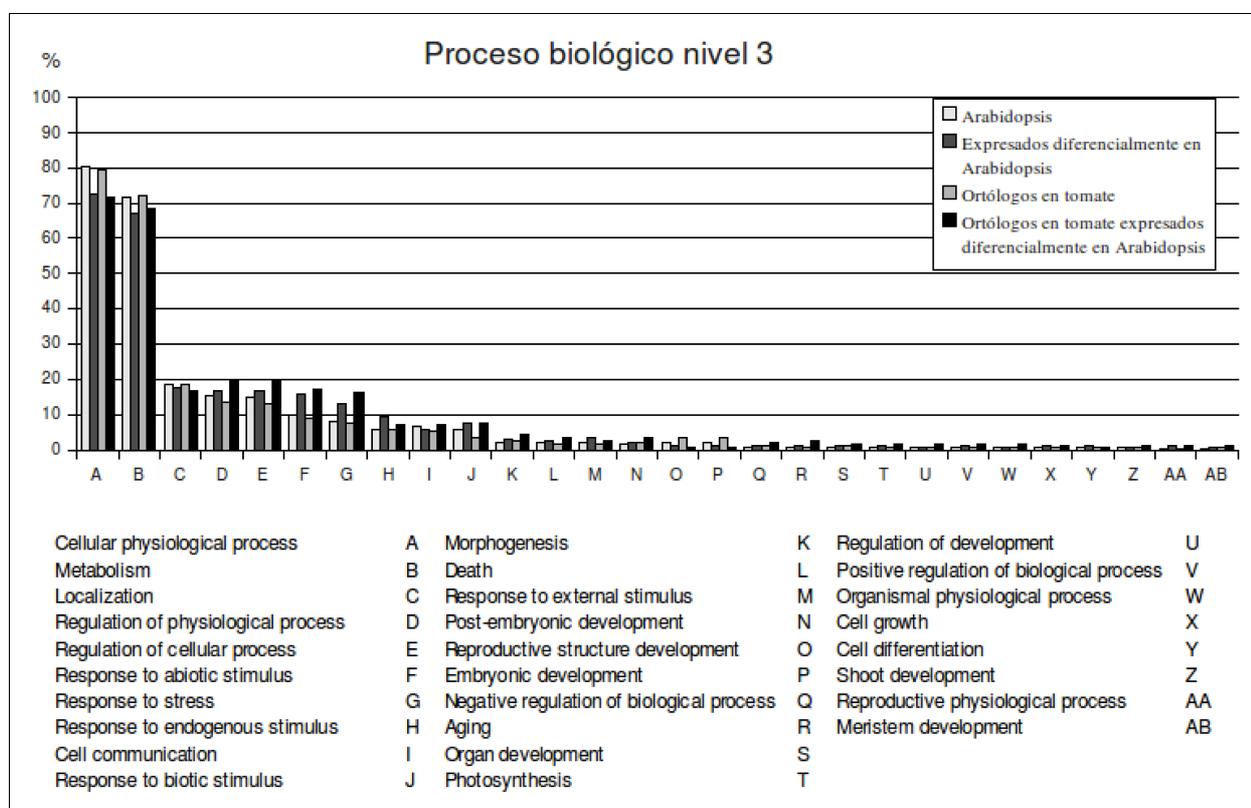
de la transcripción, y proliferación celular. También se encuentran sobre-representados los genes relacionados con el envejecimiento como ya ocurría en los genes aislados mediante la sustracción de genotecas en tomate. Cuando se realizó este mismo análisis comparando los genes diferenciales con ortólogo con respecto al total de genes con ortólogo representados en el microarray se obtuvieron resultados redundantes a los anteriores (Tabla 7).

**Tabla 6.** Comparación de los términos GO referidos a proceso biológico con el programa FatiGO.

Proceso biológico	Microarray	Diferenciales	Adj. pvalor	Nivel
Response to heat	0,38%	2,22%	4,16E-006	4
Cell wall modification	1,19%	4,71%	2,38E-005	7
Regulation of transcription, DNA-dependent	18,35%	29,74%	3,75E-004	8
Response to gibberellic acid stimulus	0,77%	2,44%	1,76E-003	5
Response to auxin stimulus	1,66%	3,84%	2,95E-003	5
Response to jasmonic acid stimulus	0,84%	2,44%	3,11E-003	4
Response to desiccation	0,04%	0,70%	3,39E-003	5
Ribosome biogenesis	2,03%	0,00%	4,80E-003	7
Macromolecule catabolism	3,35%	1,16%	8,74E-003	5
Cell proliferation	0,09%	0,78%	9,00E-003	4
RNA metabolism	3,46%	1,05%	1,04E-002	6
Lipid transport	0,78%	2,21%	1,09E-002	5
Intracellular transport	4,42%	1,98%	1,35E-002	5
Stomatal complex morphogenesis	0,01%	0,47%	1,93E-002	5
Coenzyme metabolism	1,64%	0,15%	2,58E-002	6
Ageing	0,41%	1,37%	2,61E-002	3
Microsporogenesis	0,09%	0,98%	2,98E-002	7
Anthocyanin metabolism	0,24%	3,92%	3,33E-002	9
Response to salicylic acid stimulus	0,78%	2,00%	3,81E-002	4
Translation	2,34%	0,39%	4,48E-002	7
Response to abscisic acid stimulus	0,81%	2,10%	4,71E-002	5

## Resultados

Con objeto de descartar un posible sesgo en la comparación entre *Arabidopsis* y tomate, debido a la ausencia de genes ortólogos relacionados con una determinada función biológica, se analizaron los términos GO de todos los genes representados en el microarray de *Arabidopsis* y los genes con ortólogo en tomate. La figura 20 contiene una representación de todos los términos GO con un porcentaje superior al 1% en el microarray de *Arabidopsis*, de los genes expresados diferencialmente según el análisis SAM, de todos los genes con ortólogo en tomate y de todos los genes diferencialmente expresados con ortólogo en tomate. No se detectó ninguna diferencia entre los porcentajes de los genes de *Arabidopsis* y los genes con ortólogo.



**Figura 20.** Porcentaje de los diversos términos GO referidos a proceso biológico.

## 2. Análisis transcriptómico del desarrollo del carpelo en tomate

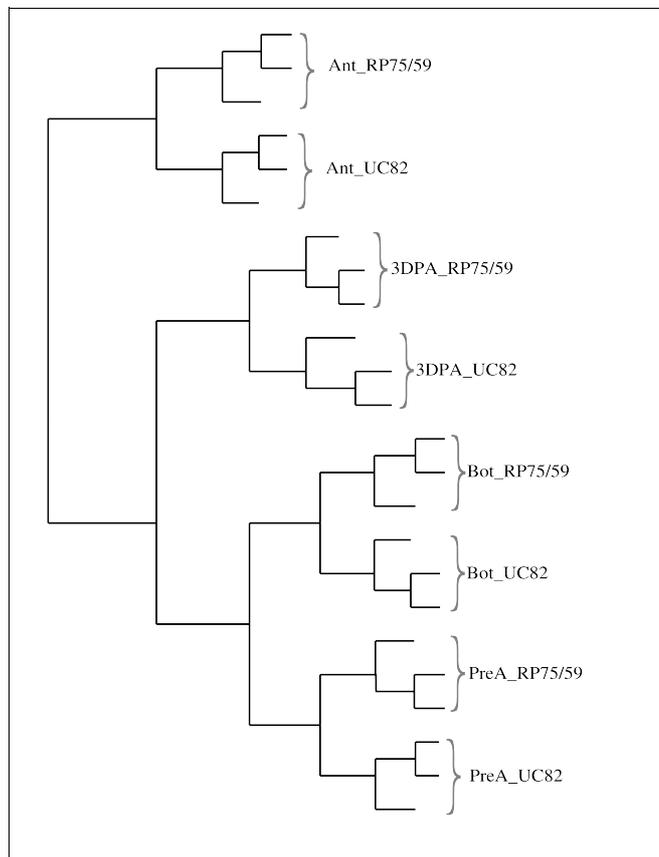
El desarrollo de la flor y concretamente del carpelo influye mucho en el porcentaje de cuajado del fruto. Por ello, en esta tesis se identificaron los genes implicados en estos procesos de desarrollo, mediante el análisis del transcriptoma de carpelos en diferentes estadios de desarrollo, de dos líneas de tomate (UC82 y RP75/59) (Pascual *et al*, 2009) (Anexo 4). Como variedad control se empleó UC82, que se caracteriza por su alto porcentaje de cuajado en condiciones ambientales favorables, y que es incapaz de producir frutos de características similares a los frutos con semillas en ausencia de polinización y fecundación. La variedad RP75/59, a diferencia de UC82, es una variedad partenocárpica facultativa capaz de producir frutos con y sin semillas con idénticas características. Presenta un alto porcentaje de cuajado incluso en condiciones desfavorables para la polinización y fecundación, bajo las cuales produce únicamente frutos sin semillas.

El transcriptoma a lo largo del desarrollo del carpelo en ambas líneas se caracterizó en condiciones de invernadero, bajo las cuales el cuajado estaba alrededor del 95%. Los estadios de desarrollo seleccionados para el análisis fueron cuatro: botón floral (botón, longitud de los pétalos entre 4,5 y 7 mm), de botón floral a pre-antesis (pre-antesis, longitud de los pétalos entre 7,5 y 9mm), antesis (momento de la apertura de los pétalos y liberación del grano del polen) y 3DPA (3 días post antesis). El transcriptoma se caracterizó hibridando el GeneChip Tomato Genome Array de Affymetrix, que permite conocer la expresión de aproximadamente 9200 transcritos. Se realizaron tres replicados biológicos de cada uno de los cuatro estadios de desarrollo analizados. Los resultados de las hibridaciones se normalizaron y la expresión génica se transformó a una escala log<sub>2</sub>. Los datos se encuentran depositados en la base de datos ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/>) con el número de acceso E-MEXP-1643.

Una vez se obtuvo la expresión de los diferentes genes, con objeto de determinar las diferencias entre los estadios de desarrollo, se realizó un análisis cluster de las hibridaciones realizadas. Las muestras se clasificaron únicamente en función de los genes variables, para evitar ruido de fondo (Figura 21). En todos los estadios analizados los replicados biológicos se agruparon juntos, las muestras se agruparon por estadios de desarrollo y no por líneas. Los

## Resultados

estadios de botón floral y pre-antesis se agruparon juntos, y con el estadio de 3DPA, a pesar de ser el más alejado a nivel temporal. El estadio de antesis no se agrupó con ninguno de los otros estadios analizados. En todos los nodos el valor de bootstrap fue 100.



**Figura 21.** Cladograma de las hibridaciones agrupadas en función del nivel de expresión de los genes variables. Bot (pétalos entre 4,5 y 7 mm), PreA (pétalos entre 7,5 y 9 mm), Ant (antesis) y 3DPA (3 días post antesis). Los valores de bootstrap del árbol fueron 100 en todos los nodos.

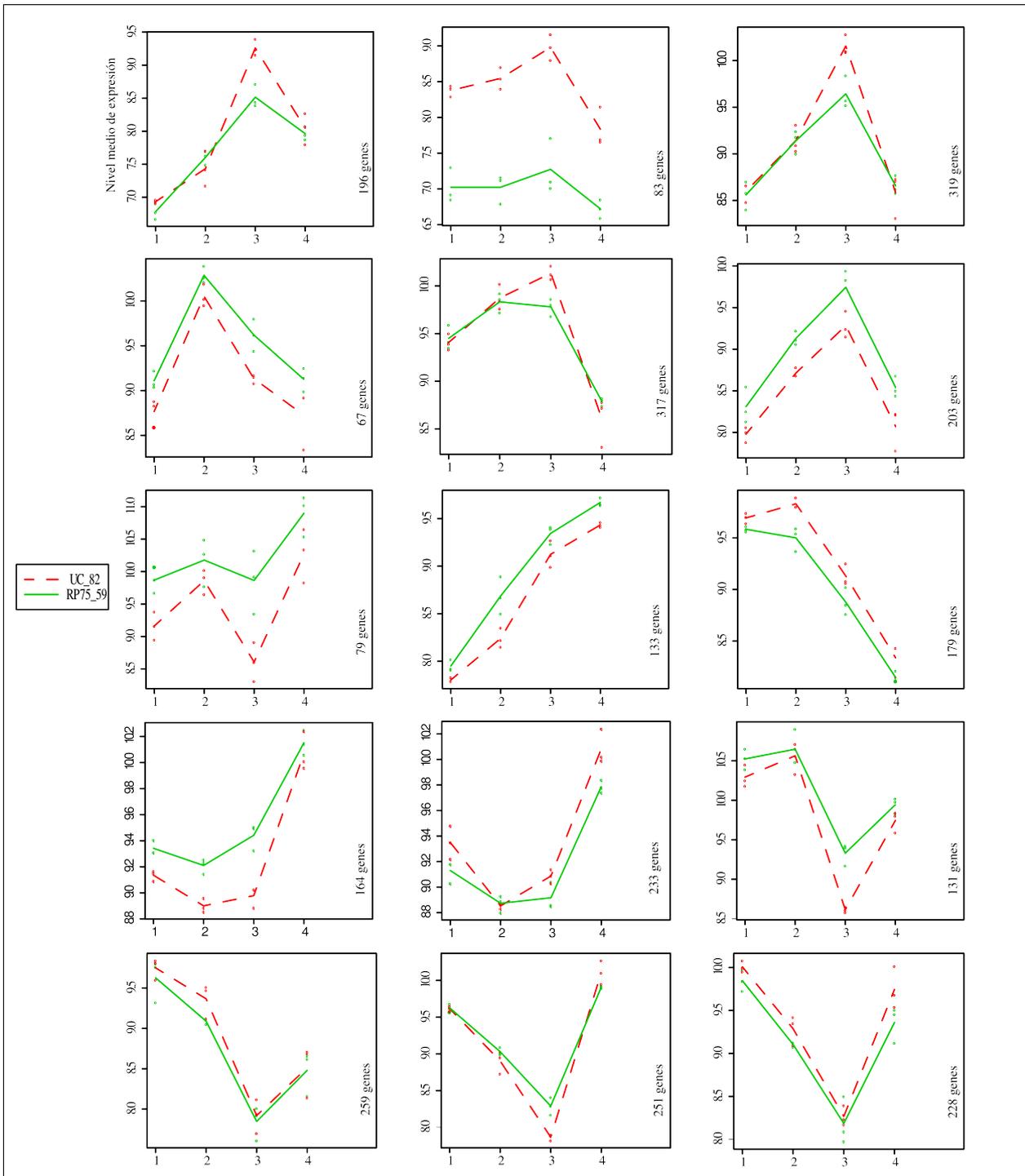
### 2.1 Aislamiento de genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo en tomate

Los genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo se identificaron con el programa maSigPro (Conesa *et al*, 2006). Este programa está especialmente diseñado para analizar experimentos de microarrays en los que una de las variables es el tiempo. Primero el usuario define los factores que diferencian las distintas hibridaciones, en nuestro caso había un factor temporal que tiene cuatro niveles (botón, pre-antesis, antesis y 3DPA) y un factor de fondo genético (puesto que estamos trabajando con dos líneas diferentes). Con esta información el

programa define una variable para cada factor y otra para la interacción entre ambos. En base a estas variables y a los distintos niveles de expresión para cada uno de los genes en cada una de las hibridaciones, el programa define un modelo general para el nivel de expresión de los genes. Tras esto, se seleccionan los genes que se desvían de este modelo general significativamente. Por último, se analizan estos genes y se determina que variables son responsable de la desviación de la expresión del gen (los genes pueden agruparse en más de una variable).

En nuestro análisis intervenían dos factores, el tiempo y la variedad, de manera que al definir estos factores el modelo generó tres variables: TIME, variable tiempo, que agrupó los genes que cambian a lo largo del desarrollo del carpelo en la variedad control (UC82), TIME RP75/59 que agrupó los genes que cambian a lo largo del desarrollo del carpelo de manera diferente en la línea RP75/59 con respecto al control, y UC82 vs RP75/59 que incluyó los genes con distinto nivel de expresión en las dos líneas.

La variable TIME incluyó 2842 genes que estaban regulados a lo largo del desarrollo del carpelo (Anexo 5). Estos genes se agruparon en 15 clusters, en función de su nivel de expresión, empleando el algoritmo K-means (Figura 22). El cluster 1 incluyó 196 genes cuyo nivel de expresión presentó un aumento en el estadio de antesis, este aumento es mucho más pronunciado en la variedad control. El cluster 2 estaba formado por 83 genes que también presentaron un aumento de la expresión en antesis, pero además tenían un nivel de expresión mucho mayor en la variedad control a lo largo de todo el desarrollo del carpelo. El cluster 3 agrupó 319 genes con un patrón similar al del cluster 1. El cluster 4 incluyó 67 genes que presentaron un pico en el nivel de expresión en el estadio de pre-antesis. El cluster 5 estaba formado por 317 genes con un mayor nivel de expresión en pre-antesis y antesis. El cluster 6 agrupó 203 genes que presentaron un aumento de la expresión en antesis, pero menor nivel de expresión en la variedad control a lo largo de todo el desarrollo. El cluster 7 incluyó 79 genes que mostraron un descenso en el nivel de expresión en antesis mucho más pronunciado en la variedad control. El cluster 8 estaba formado por 133 genes cuya expresión aumentó a lo largo del desarrollo. El cluster 9 agrupó 79 genes cuya expresión disminuyó a lo largo del desarrollo del carpelo. El cluster 10 incluyó 164 genes que presentaron un descenso en el nivel de expresión en pre-antesis y un aumento a partir de este estadio hasta 3DPA.



**Figure 22.** Análisis cluster de los genes cuya expresión varía a lo largo del desarrollo del carpelo (variable TIME). El eje Y muestra el nivel de expresión y el eje X los estadios de desarrollo 1, 2, 3 y 4 son respectivamente: botón floral, pre-antesis, antesis y 3DPA. Incluye el patrón de expresión en las dos líneas.

El cluster 11 estaba formado por 233 genes con un patrón de expresión muy similar a los del cluster 10. El cluster 12 agrupó 131 genes que mostraron un descenso en el nivel de expresión en antesis, este descenso fue mucho mas pronunciado en la variedad control. El cluster 13 incluyó 259 genes que presentaron un descenso en el nivel de expresión en antesis y un aumento suave del nivel a 3DPA. El cluster 14 estaba formado por 251 genes que sufrían un descenso en el nivel de expresión en antesis y un aumento considerable de la expresión a 3DPA. El cluster 15 agrupó 228 genes con un patrón de expresión muy similar a los del cluster 14. En resumen, la mayoría de los genes presentaron variaciones en el nivel de expresión en antesis o tras este estadio.

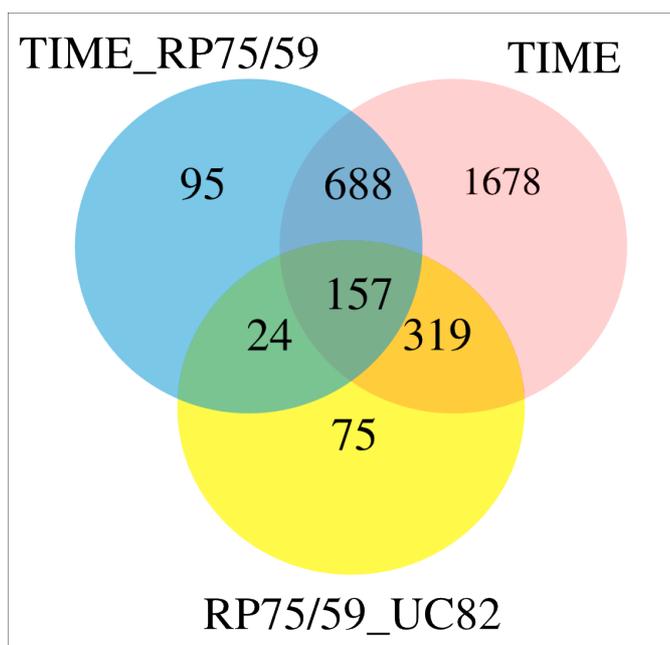
## 2.2 Aislamiento de genes expresados diferencialmente a lo largo del desarrollo del carpelo en RP75/59

La variedad RP75/59 se caracteriza por su capacidad de producir frutos incluso en ausencia de fecundación y polinización. Sin embargo, en las condiciones ambientales en que se desarrolló el ensayo es capaz de producir frutos con semillas. Se considero interesante determinar si en estas condiciones existían alteraciones en el desarrollo del carpelo, potencialmente relacionadas con la capacidad partenocárpica de esta variedad. Para identificar estas diferencias se comparó el transcriptoma de RP75/59 con el de la variedad control UC82, que es incapaz de producir frutos en ausencia de polinización y fecundación. Los genes diferencialmente expresados en esta línea fueron los agrupados en las variables TIME RP75/59 y UC82 vs RP75/59 del análisis realizado. En su gran mayoría estos genes también estaban regulados a lo largo del desarrollo normal del carpelo pero de manera diferente (Figura 23).

La variable TIME RP75/59 agrupó 964 genes (688+157+24+95 muchos de los cuales también variaban en función de otras variables ), que variaban de manera diferente al control a lo largo del desarrollo del carpelo de RP75/59. Estos genes incluyeron 845 genes (688+157) que también variaban a lo largo del desarrollo normal del carpelo (TIME), 181 genes (24+157) donde la variación se debía a diferencias de nivel entre ambas líneas (UC82 vs RP75/59) y 95 genes que variaban a lo largo del desarrollo únicamente en RP75/59. La variable UC82 vs RP75/59 agrupó 575 genes (157+319+75+24), 476 de los cuales (319+157) variaban a lo largo del desarrollo normal del carpelo (TIME), 181 (157+24) en TIME RP75/59, y 75 donde la variación se debía

## Resultados

únicamente a diferencias de nivel de expresión entre ambas líneas. Finalmente, tras eliminar los genes duplicados se seleccionaron 1358 genes ( $688+319+157+95+75+24$ ), diferenciales en la línea RP75/59 con respecto al control (TIME RP75/59 y UC82 vs RP75/59) (Anexo 6). De estos genes 1164 ( $688+319+157$ ) variaban también a lo largo del desarrollo del carpelo en la variedad control.

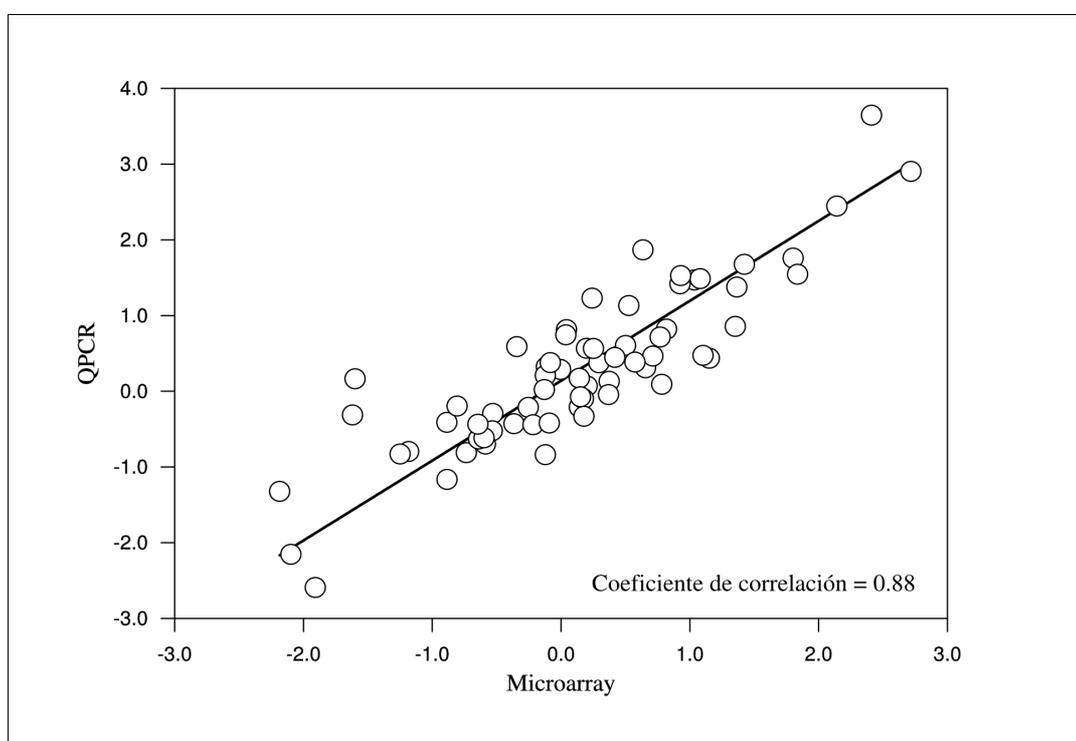


**Figure 23.** Digrama de Venn. Número de genes en el microarray regulados según las diferentes variables.

El patrón de expresión de los 1164 genes que también están regulados a lo largo del desarrollo del carpelo (TIME) (Figura 22) muestra dos tipos de diferencias entre variedades. Por un lado había genes que presentaban el mismo patrón de expresión que la variedad control, pero con diferencias en el nivel de expresión. El cluster 2 (Figura 22) agrupó los genes en los que esta tendencia era más acusada. Por otro lado existían genes donde los cambios en el nivel de expresión que se daban durante la antesis eran menores que en la variedad control, este sería el caso de los clusters 1, 3, 7 y 12 (Figura 22). En resumen, los genes con diferencias de expresión entre ambas variedades eran en su mayoría genes regulados a lo largo del desarrollo normal del carpelo, y las diferencias entre ambas variedades venían dadas principalmente por el nivel de expresión en antesis.

### 2.3 Validación de los resultados del microarray mediante PCR cuantitativa

Para validar los resultados obtenidos en el análisis del microarray se comprobó la expresión de 11 genes diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo normal del carpelo (variable TIME) mediante PCR cuantitativa a tiempo real. La expresión de estos genes se determinó en las dos líneas analizadas en los cuatro estadios (botón, pre-antesis, antesis y 3DPA). La expresión de los genes analizados se normalizó empleando al actina como gen control. Para comparar los niveles de expresión obtenidos mediante este método y mediante las hibridaciones del microarray, se calculó la diferencia en el nivel de expresión entre las dos líneas, para cada gen en cada estadio según ambos métodos. Los datos obtenidos mediante PCR cuantitativa se transformaron a una escala logarítmica, para facilitar la comparación, puesto que los datos del microarray están expresados en escala log 2. A pesar de las diferencias existentes entre los dos métodos de cuantificación, cuando se calculó la correlación entre los resultados, se obtuvo un valor de  $r=0,88$  (Figura 24).

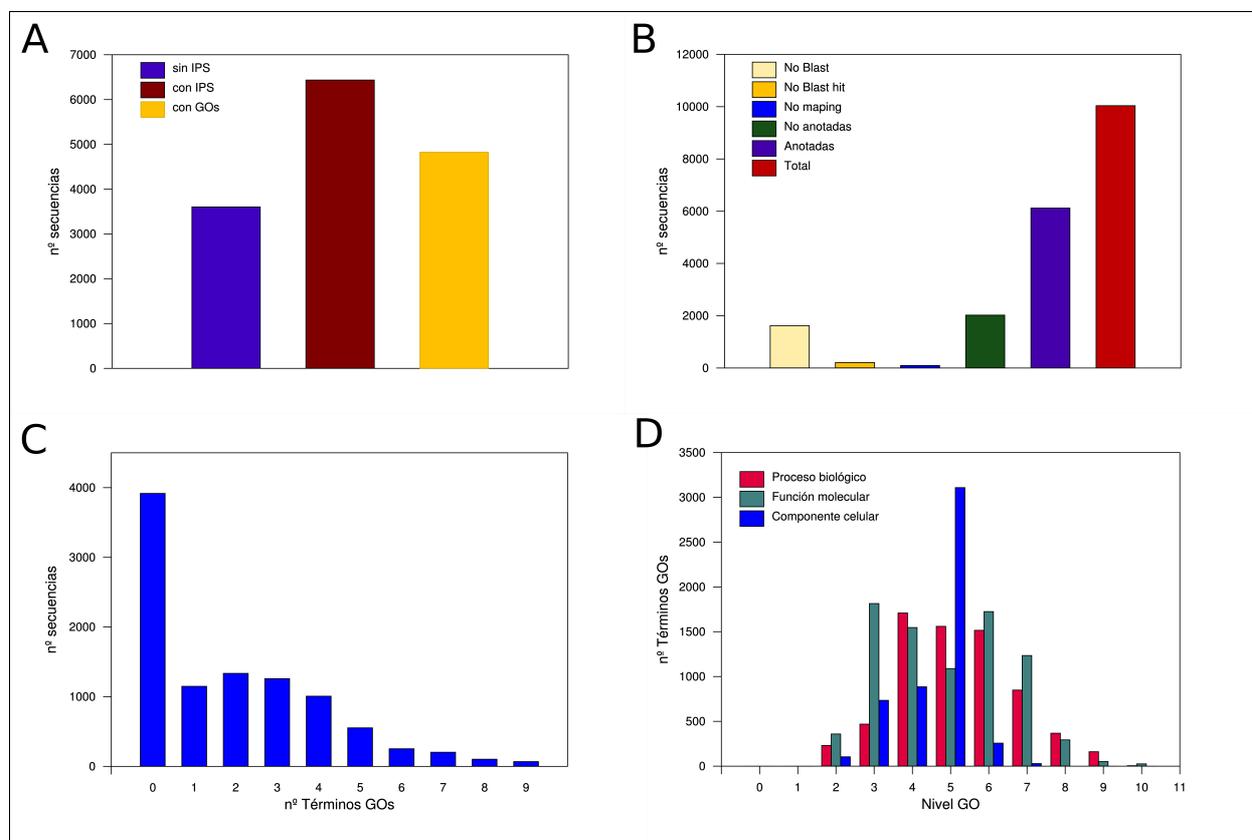


**Figura 24.** Correlación entre la expresión génica según el microarray y la expresión génica según el análisis por PCR cuantitativa. Incluye también los datos de validación de las hibridaciones de microarray descritas en el apartado 4 de resultados.

## 2.4 Anotación del Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array

Una vez identificados los genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo es necesario conocer la función de los mismos. Sin embargo la anotación, de los 9200 transcritos representados en el microarray de tomate, que proporciona Affymetrix únicamente contiene información acerca de aproximadamente un 15% de las secuencias. Por lo que para poder realizar estudios funcionales con los datos obtenidos fue necesario re-anotar el microarray. Esto se realizó empleando el programa Blast2GO (Conesa *et al*, 2005) que asigna términos GO a las secuencias que analiza, en función de su similitud con secuencias previamente anotadas, y en función de los dominios de proteínas que contiene la secuencia. Al realizar el BLAST con nuestras secuencias hubo 1622 que no dieron homología con ninguna secuencia, 211 en que la homología fue muy baja y 2023 que a pesar de tener homología con otra secuencia no pudieron ser anotadas (Figura 25B). Al analizar los dominios de proteínas que contenían las secuencias se detectaron dominios en 6435 secuencias y se pudieron asignar términos GO a 4833 secuencias (Figura 25A). Finalmente, con este sistema se consiguieron asignar términos GO a 6121 secuencias (Anexo 7) (Figura 25B), es decir, un 60% de los genes representados en el microarray frente al 15% original. La mayoría de las secuencias anotadas tenían asignado más de un término GO: 1335 tenían dos términos asignados, 1259 tres términos, 1007 cuatro términos, y 1184 entre 5 y 9 términos (Figura 25C).

La precisión de la anotación viene dada por el nivel de los términos GO, conforme mayor es el nivel se puede considerar que la anotación es más precisa. Los términos GO se agrupan en tres categorías: proceso biológico, función molecular y componente celular. En la categoría de proceso biológico se anotaron 6870 términos, la mayoría de los cuales pertenecían a los niveles 4, 5 y 6, aunque había anotados términos hasta el nivel 10. En la categoría de función molecular se anotaron 8144, la mayoría de términos anotados estaban entre los niveles 3 y 7, llegando a anotar términos hasta el nivel 11. En la categoría de componente celular se anotaron 5123 términos, casi todos pertenecientes al nivel 5, aunque se llegaron a anotar términos de nivel 8. En resumen, los términos GO anotados oscilaban entre el nivel 2 y el nivel 11 concentrándose alrededor del nivel 6 (Figura 25D).



**Figure 25.** **A.** Asignación de términos GO en función de los dominios de proteína, con el programa InterProScan. **B.** Resultados de la anotación del microarray. **C.** Distribución del número de términos GO asignados a las secuencias analizadas. **D.** Distribución de los términos GO del Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array.

## 2.5 Estudio funcional de los genes diferenciales

A partir de la nueva anotación del microarray se realizaron los estudios funcionales de los genes diferencialmente expresados con el programa FatiGO (Al-Shahrour *et al*, 2004). Usando el programa se pudo determinar que procesos biológicos estaban significativamente sobre y sub-representados en los genes diferenciales con respecto al resto de genes presentes en el microarray.

## Resultados

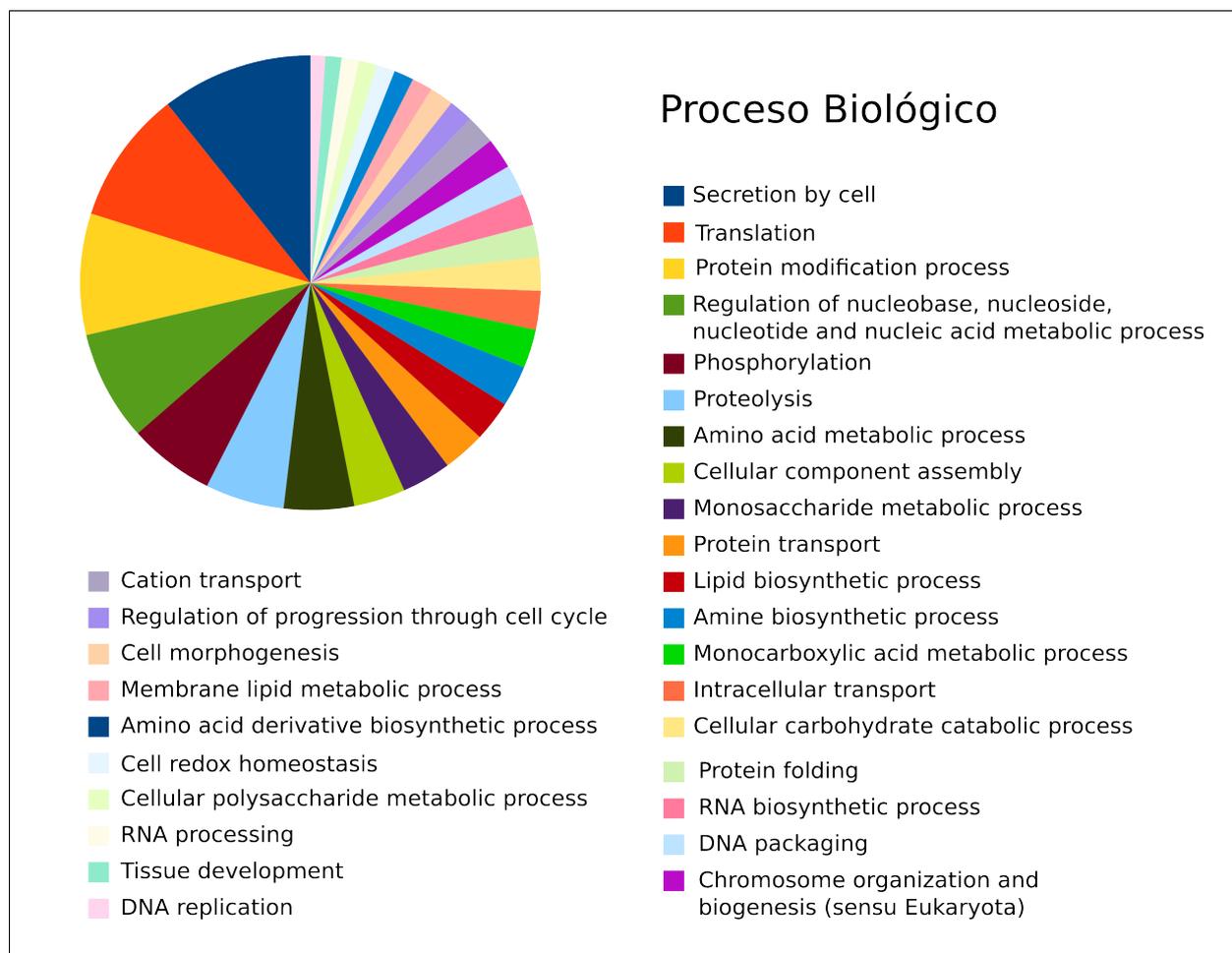
### 2.5.1 Genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo

Mediante el análisis del transcriptoma del carpelo de dos variedades de tomate se ha conseguido aislar 2842 genes, que se encuentran regulados a lo largo del desarrollo del carpelo (variable TIME). Usando el programa FatiGO se pudo determinar qué procesos biológicos estaban significativamente sobre y sub-representados con respecto al resto de genes presentes en el microarray (Tabla 8). Estos procesos son los implicados en el desarrollo del carpelo. Los términos GO sobre-representados fueron: regulación de ciclo celular y regulación de la progresión del ciclo celular. Entre los términos sub-representados se encontraron términos relacionados con: el metabolismo de RNA, biopolímeros y macromoléculas, y transporte mediado por vesículas.

**Tabla 8.** Términos GO relacionados con proceso biológico, significativamente sobre o sub-representados, en los genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo, con respecto al resto de genes del microarray.

Proceso biológico	TIME	Microarray	Adj. pvalor	Nivel
Biopolymer metabolic process	18,00%	27,06%	9,51E-007	4
mRNA metabolic process	0,00%	2,18%	3,20E-005	6
mRNA processing	0,00%	2,43%	8,05E-004	7
RNA metabolic process	4,52%	8,94%	1,70E-003	5
RNA splicing	0,14%	2,61%	1,70E-003	7
Macromolecule metabolic process	41,26%	48,71%	2,92E-003	3
Biopolymer catabolic process	1,04%	3,30%	1,17E-002	5
RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile	0,00%	4,89%	1,94E-002	9
RNA splicing, via transesterification reactions	0,00%	2,51%	2,03E-002	8
Regulation of cell cycle	1,98%	0,52%	3,26E-002	5
Regulation of progression through cell cycle	2,14%	0,57%	3,26E-002	6
RNA processing	1,53%	3,84%	4,31E-002	6
Vesicle-mediated transport	0,85%	2,70%	4,59E-002	5

Para tener una idea global de la función de todos los genes diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo del carpelo, se determinaron los términos GO representados por un porcentaje de genes superior al 2%. Entre estos nuevos términos, además de procesos claramente relacionados con el ciclo celular, se encontraron genes relacionados con: metabolismo de proteínas, secreción celular, fosforilación, metabolismo de monosacáridos y síntesis de ADN (Figura 26).



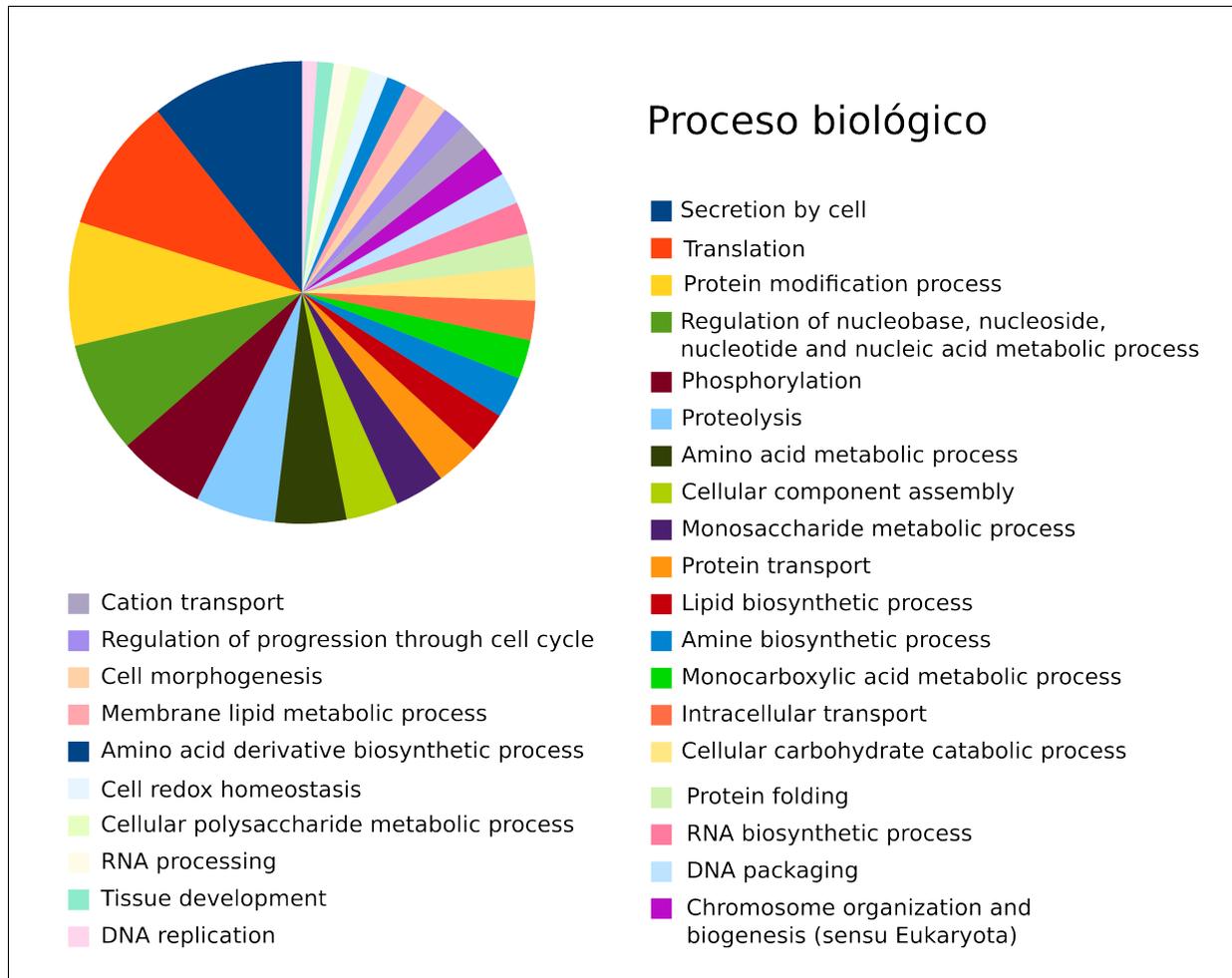
**Figura 26.** Términos GO representados por más de un 2% de genes, regulados a lo largo del desarrollo del carpelo (TIME).

### 2.5.2 Genes expresados diferencialmente en RP75/59 a lo largo del desarrollo del carpelo

Los porcentajes de los términos GO representados por más de un 2% de los genes expresados de manera diferente entre las dos líneas se muestran en la Figura 27. La mayoría de los términos estaban también presentes en los genes regulados a lo largo del desarrollo del

## Resultados

carpelo en la variedad control en porcentajes similares. Únicamente se identificaron cuatro nuevos términos: metabolismo de lípidos de membrana, replicación del ADN, homeostasis y desarrollo tisular.



**Figura 27.** Términos GO representados por más de un 2% de genes, regulados a lo largo del desarrollo del carpelo (TIME).

### 2.6 Genes relacionados con el ciclo celular

Como se muestra en el análisis funcional de los genes diferenciales hay un gran número de genes relacionados con la división y ciclo celular regulados durante el desarrollo del carpelo. Cuando se analizó la expresión de los genes diferenciales (TIME), se diferenciaron claramente dos grupos de genes (Tabla 9). El grupo 1, agrupó genes expresados durante el estadio de botón

floral cuya expresión bajó al acercarse la antesis y volvió a subir en el estadio de-3DPA (mayor expresión en los estadios en que la división celular estaba más activa). Todas las ciclinas y las ciclinas dependientes de kinasas, excepto un gen homólogo a la ciclina H, pertenecían a este grupo. El grupo 2 incluyó genes cuya expresión estaba activada en los estadios de pre-antesis y antesis, momento en el que existe una disminución de la división celular.

**Tabla 9.** Niveles de expresión según el microarray de los genes relacionados con división y ciclo celular diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo del carpelo (TIME) en UC82.

Sonda del microarray	Descripción del gen	Botón	preAnt	Ant	3DPA
<b>GRUPO 1</b>					
<b>Cell cycle arrest</b>					
Les.450.1.S1_at	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3	9,42	7,88	8,2	9,53
<b>Cell cycle checkpoint</b>					
LesAffx.66157.1.S1_at	Mitotic spindle assembly checkpoint protein mad2a (mad2-like 1)	9,86	8,6	7,93	10,17
<b>Cell division related</b>					
LesAffx.67274.1.S1_at	Aurora kinase b	7,1	6,36	6,45	7,96
<b>G2/M transition of mitotic cell cycle</b>					
Les.3713.1.S1_at	Cyclin-dependent kinase	11,2	9,74	7,14	11,25
<b>M phase of meiotic cell cycle</b>					
Les.89.1.S1_at	RAD51	8,49	7,41	7,13	8,94
<b>M phase of mitotic cell cycle</b>					
LesAffx.25483.1.S1_at	Anaphase-promoting complex subunit 11 homolog	9,91	9,26	9,4	10,09
LesAffx.60610.2.S1_at	Ubiquitin-conjugating enzyme e2c	11,59	9,92	7,69	12,08
<b>Regulation of cyclin-dependent protein kinase activity</b>					
Les.2589.1.S1_at	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1b	12,08	11,61	11,75	12,46
<b>Regulation of progression through cell cycle</b>					
Les.103.1.S1_at	Type-a like cyclin	10,12	8,81	8,2	10,38
Les.104.1.S1_at	Cyclin 2b protein	8,3	6,89	5,69	8,48
Les.105.1.S1_at	Type-b cyclin	7,85	6,79	6,34	7,97
Les.107.1.S1_at	Cyclin a2	8,83	7,55	5,45	8,67

**Tabla 9.** Niveles de expresión según el microarray de los genes relacionados con división y ciclo celular diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo del carpelo (TIME) en UC82(cont.).

Sonda del microarray	Descripción del gen	Botón	preAnt	Ant	3DPA
<b>Regulation of progression through cell cycle</b>					
Les.169.1.A1_at	Type-b cyclin	4,94	4,15	4,07	5,14
Les.169.1.S1_at	Type-b cyclin	8,65	6,8	4,09	9,32
Les.3055.1.S1_at	Cyclin d3-2	12,2	11,57	10,09	11,28
Les.351.1.S1_at	Cyclin-dependent kinase	10,46	8,98	7,26	11,11
Les.3519.1.S1_at	Cyclin d3-2	11,48	10,56	9,47	12,28
Les.3520.1.S1_at	Cyclin d3-2	11,72	10,71	9,82	12,6
Les.4444.1.S1_s_at	Cyclin d	10,72	10,11	8,31	9,8
Les.5343.1.S1_at	Cell division control protein 6	7,91	6,65	6,21	8,41
Les.5346.1.S1_at	CDC2+CDC28-related protein kinase	9,11	8,67	8,96	9,6
Les.5569.1.S1_a_at	Protein phosphatase 2	9,8	9,42	9,51	10,2
LesAffx.19390.1.S1_at	CCNB2_MEDVAG2 mitotic-specific cyclin-2 (b-like cyclin)	9,26	8,32	6,95	9,54
LesAffx.4297.1.S1_at	Mitotic cyclin	10,03	8,55	5,06	9,8
Les.2949.1.S1_at	PCNA2 proliferating cell nuclear antigen 2	12,24	10,96	10,59	12,39
<b>DNA replication</b>					
Les.5283.1.S1_at	DNA replication licensing factor mcm5	11,16	10,09	9,71	11,23
Les.4978.1.S1_at	DNA replication licensing factor	11,23	10,2	9,88	11,15
<b>GRUPO 2</b>					
<b>Cell division related</b>					
Les.2123.2.S1_at	Regulator of chromosome expressed	7,77	8,68	8,44	7,3
Les.5200.1.S1_at	Regulator of chromosome rcc1	9,78	9,93	9,94	9,03
Les.5878.1.S1_at	MEI2-like protein	9,9	9,9	10,57	9,77
<b>Cell cycle peptidylprolyl isomerase</b>					
Les.5275.1.S1_at	TRP-containing protein	9,37	9,47	10,18	9,58
<b>Cyclin h</b>					
Les.5620.1.S1_at	Cyclin h	7,69	7,29	8,29	8,08

## 2.7 Genes relacionados con hormonas

Las hormonas vegetales juegan un papel muy importante en la regulación de los diversos procesos de desarrollo en plantas, especialmente en la regulación del cuajado. De hecho, cuando se investigaron los genes relacionados con hormonas regulados a lo largo del desarrollo del carpelo (TIME) se encontraron más de 100 genes con expresión diferencial (Tabla 10).

Se detectaron 40 genes relacionados con auxinas (Tabla 10) que incluían genes de síntesis, de respuesta y de transporte de la hormona. En cuanto al patrón de expresión de estos genes no se detectó ninguna tendencia general. También se detectaron 20 genes relacionados con giberelinas, entre los que se encontraron genes de síntesis como GA20-oxidasas y genes de respuesta a la presencia de esta hormona. Estos genes tampoco presentaron ningún patrón de expresión característico.

Además, estaban regulados 38 genes relacionados con el etileno, entre ellos había genes de síntesis de etileno, receptores y genes de respuesta. Al analizar el patrón de estos genes se detectó una tendencia mayoritaria, 28 de los genes presentaban un claro descenso en la expresión a 3DPA con respecto a los estadios previos. Todos los genes relacionados con el metabolismo del etileno mostraron este patrón excepto dos, la s-adenosilmetionina sintetasa que estaba activada en pre-antesis y 3DPA, y la *ACS1A* cuya expresión aumentó desde botón floral hasta 3DPA. Del resto de genes relacionados con etileno, cinco presentaban un mayor nivel de expresión en botón floral y a 3DPA, y los otros tres estaban más expresados en botón floral y pre-antesis.

También se detectaron 12 genes relacionados con ácido abscísico, en función de su nivel de expresión se distinguían dos grupos. El grupo 1 formado por ocho genes claramente activados durante la antesis y el grupo 2 formado por cuatro genes claramente inhibidos durante este estadio. Por último, se detectaron 8 genes relacionados con citoquininas, siete de los cuales presentaban un claro aumento de expresión durante la antesis.

## Resultados

**Tabla 10.** Nivel de expresión según el microarray de los genes relacionados con hormonas diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo del carpelo (TIME) en UC82.

Sonda del microarray	Descripción del gen	Botón	preAnt	Ant	3DPA
<b>AUXINAS</b>					
LesAffx.42809.1.S1_at	flavin-containing monooxygenase family protein fmo family protein	4,11	3,71	3,75	7,18
LesAffx.65348.1.S1_at	Anthranilate synthase alpha subunit	9,61	8,87	8,43	9,34
Les.561.1.A1_at	Auxin efflux carrier family protein	7,79	8,15	8,21	7,36
Les.5177.1.S1_at	Auxin-responsive gh3-like protein	4,76	6,08	5,48	6,14
Les.256.1.S1_s_at	Aux/iaa protein	10,37	10,52	11,26	10,7
Les.3052.2.S1_at	Nucleoside diphosphate kinase 2	9,96	9,29	8,47	10,03
LesAffx.49488.1.S1_at	Auxin-responsive family protein	4,62	5,09	5,84	4,31
LesAffx.5977.1.S1_at	ROP family GTPase	10,38	10,11	9,36	10,59
Les.3216.1.S1_at	Auxin conjugate hydrolase	9,09	10,73	9,28	10,36
Les.5421.1.S1_at	IAA amidohydrolase	8,88	9,66	9,22	9,26
Les.3768.1.S1_at	Aminopeptidase p	10,72	11,1	11,49	10,78
Les.4473.1.S1_at	Spermine synthase	9,23	9,41	9	7,54
Les.5814.1.S1_at	Inorganic pyrophosphatase	11,6	11,27	11,17	12,39
LesAffx.10520.1.S1_at	Auxin efflux carrier family protein	4,71	4,44	4,53	5,31
LesAffx.46368.1.S1_at	Aux1-like permease	9,54	10,13	11,38	9,89
LesAffx.52437.1.S1_at	Auxin efflux carrier family protein	5,07	6,41	7,77	5,77
Les.5286.1.S1_at	Auxin response factor	10,1	8,07	6,07	10,41
Les.5323.1.S1_at	Auxin response factor	11,11	10,53	10,04	11,21
Les.123.1.S1_at	Auxin-induced protein	5,87	7,57	6,05	4,61
Les.4501.1.S1_at	Auxin-induced protein	5,9	5,46	5	5,96
Les.5138.1.S1_at	Auxin-induced protein	11,3	10,87	10	10,31
LesAffx.1251.1.S1_at	Auxin-regulated protein	7,88	8,72	8,06	6,63
LesAffx.15284.1.S1_at	Auxin-repressed protein	11,62	12,71	13,67	10,32
Les.4087.1.S1_at	Auxin-responsive protein IAA8	11	12,18	12,4	10,94
Les.192.2.S1_at	Dormancy auxin associated family protein	9,01	10,05	11,68	9,13
LesAffx.2303.1.S1_at	Aldo keto reductase family	7,4	7,99	8,08	6,8
Les.165.1.S1_at	Stem-specific protein expressed	11,7	11,8	11,69	10,49

**Tabla 10.** Nivel de expresión según el microarray de los genes relacionados con hormonas diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo del carpelo (TIME) en UC82 (cont.).

<b>Sonda del microarray</b>	<b>Descripción del gen</b>	<b>Botón</b>	<b>preAnt</b>	<b>Ant</b>	<b>3DPA</b>
<b>AUXINAS</b>					
Les.2938.2.S1_at	Hypothetical plant protein	8,78	8,98	8,62	9,81
Les.4383.1.S1_at	Metalloprotease inhibitor	4,92	5,91	12,42	10,25
LesAffx.6614.2.S1_at	Membrane protein	5,71	6,02	5,05	4,5
Les.207.1.S1_at	Aluminum-induced protein	11,79	13,11	13,73	11,97
Les.3623.1.S1_at	SAR1 gtp-binding secretory factor	10,43	10,73	10,46	11,18
Les.3707.1.A1_at	Auxin-responsive protein IAA2	4,94	4,59	4,53	5,94
Les.3707.1.S1_at	Auxin-responsive protein IAA2	6,38	5,61	4,68	7,95
Les.4097.1.S1_at	Auxin-regulated protein	8,54	9,16	10,03	7,03
Les.5154.1.S1_at	Vesicle-associated membranesynaptobrevin 7b	11,93	11,99	12,42	11,67
Les.5312.1.S1_at	GH3-like protein	8,18	9,11	8,58	7,75
LesAffx.33224.1.S1_at	MYB transcription factor	6,48	6,19	5,72	6,05
LesAffx.53591.1.S1_at	MYB-related transcription factor	9,23	10,78	9,4	9,47
LesAffx.67531.1.S1_at	AXR2/IAA7	6,92	6,14	4,23	8,49
<b>GIBERELINAS</b>					
Les.5260.1.S1_at	Chitin-inducible gibberellin- responsive protein	10,25	10,32	10,5	9,59
Les.5791.1.S1_at	Chitin-inducible gibberellin- responsive protein	8,88	8,37	8,51	9,21
LesAffx.26970.1.S1_at	Chitin-inducible gibberellin- responsive protein	4,59	5,4	5,74	4,6
LesAffx.60966.2.S1_at	Chitin-inducible gibberellin- responsive protein	8,84	9,57	9,65	8,21
Les.4335.2.S1_at	Gibberellin 2-oxidase	4,26	5,76	7,41	6,71
Les.63.1.S1_at	Gibberellin 20-oxidase 3	8,04	6,8	5,75	8,12
Les.64.1.S1_at	Gibberellin 20-oxidase 1	8,57	6,19	4,59	9,51
Les.65.1.S1_at	Gibberellin 20-oxidase 2	8,74	7,52	5,62	6,87
Les.10.1.S1_at	Gibberellin 3 beta-hydroxylase	6,33	7,6	7,51	7,47
Les.9.1.S1_at	Gibberellin 3 beta-hydroxylase	7,41	8,78	10,33	7,07
LesAffx.71330.1.S1_at	Gibberellin 3-oxidase	4,49	4,29	5,54	4,5

## Resultados

**Tabla 10.** Nivel de expresión según el microarray de los genes relacionados con hormonas diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo del carpelo (TIME) en UC82 (cont.).

Sonda del microarray	Descripción del gen	Botón	preAnt	Ant	3DPA
<b>GIBERELINAS</b>					
LesAffx.344.2.S1_at	GAST1 protein homolog	11,41	12,18	13,83	12,33
Les.5855.1.S1_at	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	11,55	11,78	12,28	11,85
Les.5621.1.S1_at	GA 2-oxidase	8,77	8,15	6,59	8,05
Les.3625.1.S1_at	GASA5-like protein	10,69	9,55	8,16	10,88
Les.4766.1.S1_at	GAST1 protein homolog	10,86	11,03	10,15	11,55
Les.827.1.S1_at	gasa5-like protein	12,35	12,31	10,85	10,25
LesAffx.14450.1.S1_at	gip1-like protein	11,03	10,42	7,48	8,04
LesAffx.16672.1.S1_at	cxe carboxylesterase	7,23	7,46	9,28	7,47
LesAffx.344.5.S1_at	gast1 protein homolog	12,11	12,72	14,03	12,8
LesAffx.66713.1.S1_at	FPF1 protein	6,35	6,36	8,85	5,78
<b>ETILENO</b>					
Les.354.1.S1_at	KNAT3 homeodomain protein	9,93	10,45	10,51	9,17
Les.3067.3.S1_at	S-adenosylmethionine synthetase	11,59	12,5	11,42	12,37
Les.5917.1.S1_at	ACC oxidase ACO5	6,53	7,54	7,28	4,94
LesAffx.64946.1.S1_at	AP2-domain dna-binding protein	9,36	8,65	5,11	7,72
Les.3465.1.S1_at	Ethylene receptor	6,24	5,92	7,71	7,34
Les.35.1.S1_at	Ethylene receptor	7,1	7,21	8,98	8,08
Les.3500.1.S1_at	Ethylene receptor	9,46	9,51	9,01	7,87
Les.36.1.S1_at	Ethylene receptor	9,95	10,66	11,7	10,76
Les.85.1.S1_at	Ethylene receptor	9,54	9,66	11,08	9,87
LesAffx.51274.1.S1_at	Ethylene response factor 5	9,87	9,75	9,06	8,02
Les.3573.1.S1_at	Ethylene responsive element binding factor 2	9,39	9,87	10,25	8,64
Les.4140.1.S1_at	Ethylene responsive element binding factor 2	11,53	11,64	11,8	10,49
Les.444.1.S1_at	Ethylene-responsive element binding protein	12,34	12,51	13,19	12,04
LesAffx.67113.1.S1_at	Ethylene-responsive family protein	11,28	11,37	10,94	10,36
Les.1498.1.S1_at	Fiber proteinexpressed	7,71	8,11	8,56	7,74

**Tabla 10.** Nivel de expresión según el microarray de los genes relacionados con hormonas diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo del carpelo (TIME) en UC82 (cont.).

Sonda del microarray	Descripción del gen	Botón	preAnt	Ant	3DPA
<b>ETILENO</b>					
Les.4233.1.S1_at	Universal stress proteinfamily protein	4,66	5,88	6,08	4,48
Les.4139.1.S1_at	AP2 transcription factor	6,77	6,24	7,64	6,23
Les.4965.1.S1_at	UPF0326 proteinexpressed	9,59	10,61	11,7	10,07
Les.3627.1.S1_at	2-oxoglutarate-dependent	6,25	8,89	10,47	6,74
LesAffx.1861.2.S1_at	2-oxoglutarate-dependent	5,29	7,02	7,83	6,85
Les.132.1.S1_at	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	9,46	9,35	12,61	11,55
Les.3225.2.S1_at	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	10,34	10,86	12,27	10,73
Les.1841.1.S1_at	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase LeACS1A	6,94	7,91	9,11	9,45
Les.22.1.S1_at	12-oxophytodienoate reductase	10,83	11,37	11,11	10,21
Les.2747.2.S1_at	3-ketoacyl-thiolase	8,82	10,42	9,84	8,77
Les.3140.3.S1_at	3-keto-acyl-thiolase 2	7,9	9,59	8,8	7,95
Les.3632.1.S1_at	Lipoxygenase	11,73	12,53	10,28	10,2
Les.3718.1.S1_at	Allene oxide cyclase	11,75	12,58	10,26	11,52
Les.5312.1.S1_at	GH3-like protein	8,18	9,11	8,58	7,75
Les.5841.1.S1_at	3-keto-acyl-thiolase 2	9,6	10,44	11,68	10,35
Les.5152.1.S1_at	Mitogen-activated protein kinase	7,92	6,53	5,41	9,07
Les.126.1.S1_at	Ethylene-responsive	11,04	10,4	9,8	10,91
Les.2517.2.S1_at	Pyridoxine biosynthesis protein	10,24	10,33	8,18	9,64
Les.2721.2.S1_at	Transcriptional coactivator-like protein	10,12	10,54	10,62	9,26
LesAffx.46368.1.S1_at	Aux1-like permease	9,54	10,13	11,38	9,89
LesAffx.53591.1.S1_at	MYB-related transcription factor	9,23	10,78	9,4	9,47
LesAffx.65348.1.S1_at	Anthranilate synthase alpha subunit	9,61	8,87	8,43	9,34
<b>CITOQUININAS</b>					
Les.170.1.S1_at	Response to cytokinin stimulus	10,13	9,41	7,92	9,08
Les.3570.1.S1_at	KNAT3 homeodomain protein	9,26	9,04	9,93	9,26
Les.5558.1.S1_at	Response regulator 6	9,26	9,22	10,31	9,86

## Resultados

**Tabla 10.** Nivel de expresión según el microarray de los genes relacionados con hormonas diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo del carpelo (TIME) en UC82 (cont.).

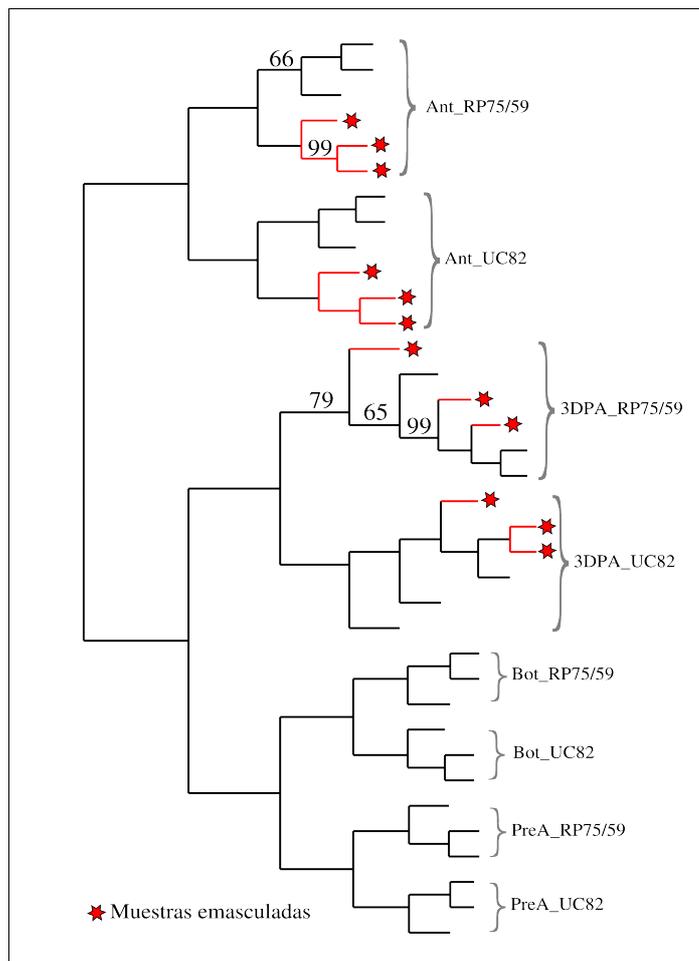
Sonda del microarray	Descripción del gen	Botón	preAnt	Ant	3DPA
<b>CITOQUININAS</b>					
Les.5790.1.S1_at	ACT domain containing expressed	7,89	8,31	9,36	8,83
Les.70.1.S1_at	STM1 protein	10,61	11,06	11,66	10,27
LesAffx.26129.1.S1_at	Two-component response regulator expressed	8,31	8,59	9,26	7,82
LesAffx.46686.1.S1_at	KNAT3 homeodomain protein	6,71	7,36	7,46	6,11
LesAffx.70722.1.S1_at	TPA: a-type response regulator 7	9,04	9,49	9,96	9,09
<b>ÁCIDO ABCSCÍICO</b>					
LesAffx.35945.1.S1_at	Short-chain dehydrogenase reductase	10,09	9,5	8,01	9,9
LesAffx.8142.1.S1_at	Abscisic acid-induced protein	10,7	10,86	10,84	9,85
Les.4655.1.S1_at	MOSC domain protein	11,01	11,48	12,18	10,6
Les.112.1.S1_at	Zeaxanthin epoxidase	9,38	9,77	10,99	8,9
Les.91.1.S1_at	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	10,07	10,71	10,7	8,72
Les.23.1.S1_at	4 protein	4,75	5,76	8,95	6,73
Les.4684.1.S1_at	CIPK-like protein expressed	9,41	9,85	10,9	10,41
LesAffx.17051.1.S1_at	Basic helix-loop-helix family protein	7,86	8,1	5,4	6,53
LesAffx.33224.1.S1_at	MYB transcription factor	6,48	6,19	5,72	6,05
LesAffx.344.5.S1_at	GAST1 protein homolog	12,11	12,72	14,03	12,8
LesAffx.4388.1.S1_at	Annexin	10,83	12,27	8,77	10,72
LesAffx.71623.1.S1_at	Jasmonic acid regulatory protein	5,01	5,95	8,2	5,51

### 3. Estudio de la expresión génica durante el cuajado partenocárpico en RP75/59

Las diferencias existentes entre el cuajado normal del fruto en tomate y el cuajado partenocárpico se estudiaron empleando la variedad UC82, que es incapaz de producir frutos en ausencia de fecundación, y la línea RP75/59 partenocárpica facultativa, capaz de producir frutos con semillas si las condiciones ambientales lo permiten. Se trabajó bajo condiciones de invernadero, donde no existe polinización cruzada, y emasculando las flores de ambas líneas dos días antes de la antesis. La variedad UC82 fue incapaz de producir frutos y en la variedad RP75/59 el cuajado fue superior al 90% produciéndose únicamente frutos sin semillas. Si tras emasculación, las flores de UC82 se polinizaban manualmente en antesis, también se obtenía un porcentaje de cuajado superior al 90%.

Para comparar los transcriptomas de ambas variedades durante el cuajado y determinar los genes implicados en el cuajado partenocárpico, se hibridó el GeneChip tomato Genome Array de Affymetrix con carpelos procedentes de flores que habían sido emasculadas dos días antes de la antesis, y polinizados únicamente en el caso de UC82. Se analizaron los estadios de antesis y 3DPA (Pascual *et al*, 2009) (Anexo 4). Los datos de las hibridaciones se encuentran depositados en la base de datos ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/>) con el número de acceso E-MEXP-1643.

Una vez obtenida la expresión de los diferentes genes, con objeto de determinar si las diferencias entre ambas líneas eran mayores que las diferencias entre estadios o que los efectos de la emasculación, se realizó un análisis cluster de todas las hibridaciones realizadas. Se descartaron los genes más constantes del microarray, y se agruparon las muestras únicamente en función del nivel de expresión de los genes más variables, para evitar ruido de fondo (Figura 28). Las muestras se agruparon por estadios y dentro de estos por líneas. Dentro del estadio de antesis, se formaron dos grupos según la línea, y las muestras emasculadas de cada línea se agruparon separadas de las no emasculadas. Sin embargo, en el estadio de 3DPA se formaron dos grupos claros en función de la línea que incluían tanto muestras emasculadas como no emasculadas, sugiriendo que la emasculación no tuvo gran influencia en la expresión génica en el carpelo dos días después y que no existieron diferencias en el momento del cuajado.

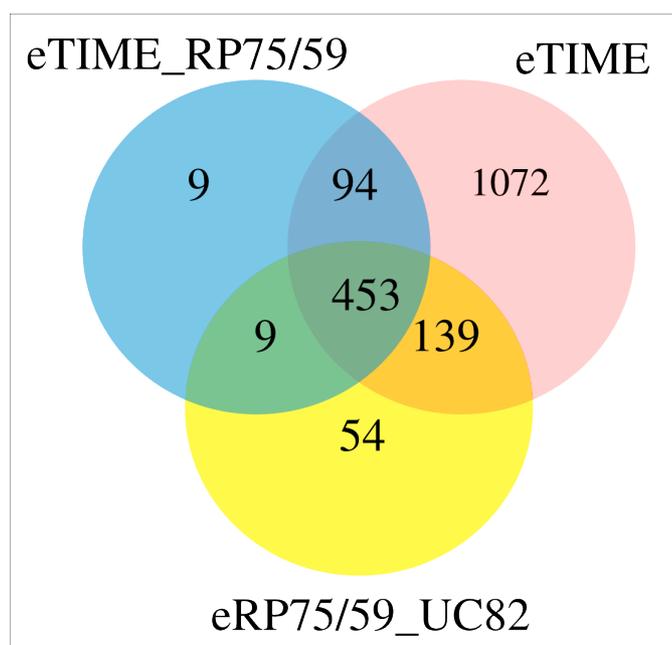


**Figura 28.** Cladograma de las hibridaciones agrupadas en función del nivel de expresión de los genes variables. Bot (pétalos entre 4,5 y 7 mm), PreA (pétalos entre 7,5 y 9mm), Ant (antes), y 3DPA (3 días post antesis). Los valores de bootstrap únicamente se muestran cuando son inferiores a 100.

### 3.1 Aislamiento de genes expresados diferencialmente durante el cuajado partenocárpico del fruto en RP75/59

Los genes expresados diferencialmente durante el cuajado del fruto partenocárpico con respecto al cuajado normal se aislaron con el programa maSigPro. En este caso se analizaron 2 estadios temporales, antesis emasculada y 3DPA emasculada, en las dos líneas. Se definieron tres nuevas variables: eTIME, donde se agrupaban los genes que estaban regulados durante el cuajado en la variedad control, eTIME RP75/59 que incluyó los genes que cambiaban de manera

diferente a lo largo del cuajado partenocárpico, y eUC82 vs RP75/59 que agrupó los genes con diferente nivel de expresión en cada línea (Figura 29). En total se detectaron 1830 genes diferencialmente expresados, la gran mayoría 1758 (1072+453+139+94) estaban regulados a lo largo del cuajado normal del fruto (eTIME). La variable eTIME RP75/59 agrupó 565 genes (453+94+9+9) que variaban de manera diferente al control en RP75/59. Estos genes incluyeron 547 genes (453+94) que también variaban en el control (eTIME), 462 genes (453+9) donde la variación se debía a diferencias de nivel entre ambas líneas (eUC82 vs RP75/59), y 9 genes que variaban únicamente en RP75/59. La variable eUC82 vs RP75/59 agrupó 655 genes (453+139+54+9), 592 de los cuales (453+139) variaban en el control (eTIME), 462 (453+9) en eTIME RP75/59, y 54 donde la variación se debía únicamente a diferencias de nivel de expresión entre ambas líneas.

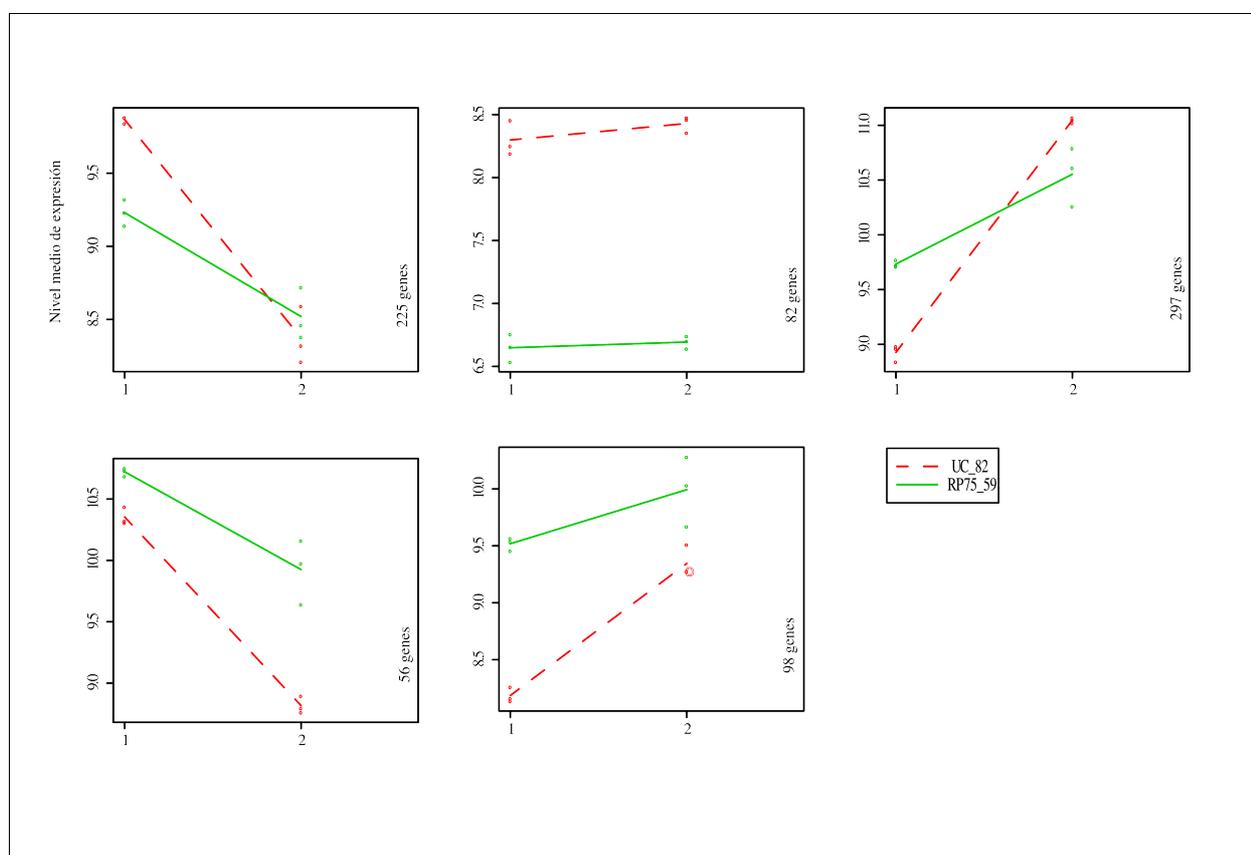


**Figure 29. Diagrama** de Venn. Número de genes en el microarray regulados según las diferentes variables.

De todos los genes diferenciales, para estudiar las diferencias entre el cuajado normal del fruto y el cuajado partenocárpico, se seleccionaron los 758 (453+139+94+54+9+9) que se expresaban de manera diferente en ambas líneas (variables eTIME RP75/59 y eUC82 vs RP75/59) (Anexo 6). Cuando se analizó el patrón de expresión estos genes se agruparon en 5

## Resultados

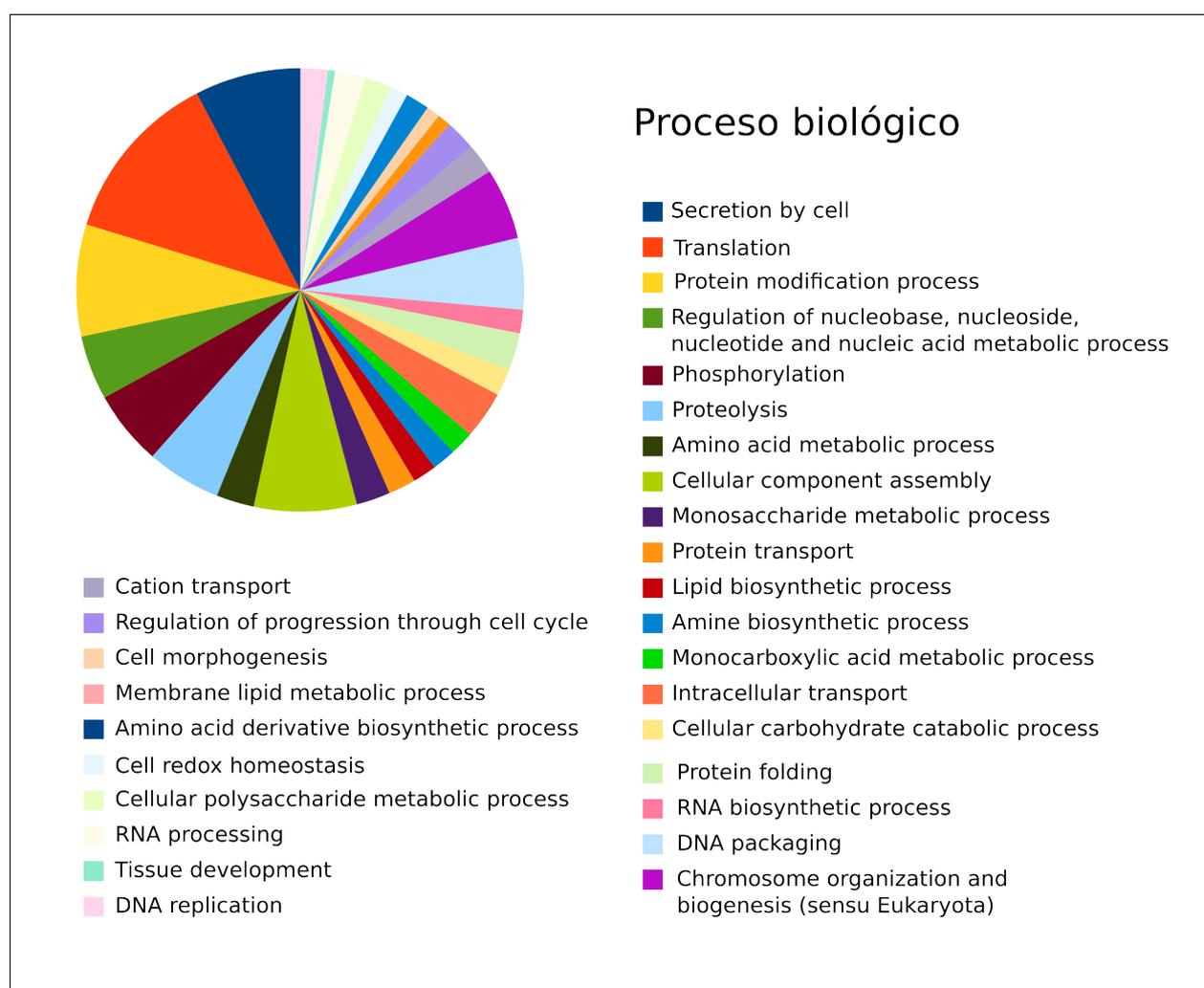
clusters (Figura 30). El cluster 1 incluyó 225 genes cuya expresión disminuía a 3DPA, en RP75/59 el nivel de expresión en antesis fue menor a la variedad control. El cluster 2 estaba formado por 82 genes cuyo nivel de expresión fue mucho mayor en la variedad control. El cluster 3 agrupó 297 cuya expresión aumentaba a 3DPA, en RP75/59 el nivel de expresión en antesis era mayor al de la variedad control, y el aumento a 3DPA no era tan pronunciado. El cluster 4 incluyó 56 genes cuya expresión disminuía a 3DPA, en RP75/59 el nivel de expresión era mucho mayor en ambos estadios. El cluster 5 estaba formado por 98 genes cuyo nivel de expresión aumentaba a 3DPA y era mucho mayor en RP75/59 en ambos estadios.



**Figure 30.** Agrupación de los genes expresados diferencialmente a lo largo del cuajado partenocárpico del fruto en función del nivel de expresión en UC82 y RP75/59. El eje Y muestra el nivel de expresión y el eje X los estadios, 1 y 2, son respectivamente carpelos en los estadios de: antesis (emasculados dos días antes), y 3 DPA (emasculados antes de la antesis y polinizados únicamente en el caso de UC82).

### 3.2 Análisis funcional de genes expresados diferencialmente durante el cuajado partenocárpico del fruto en RP75/59

A partir de la nueva anotación del microarray se identificaron los procesos biológicos regulados durante el cuajado partenocárpico del fruto. Se analizaron los términos GO en los genes diferencialmente expresados a lo largo del cuajado partenocárpico (eTIME RP75/59 y eUC82 vs RP75/59) (Figura 31). La mayoría de los términos GO coincidían con los de los genes regulados a lo largo de todo el desarrollo del carpelo (variable TIME), pero se detectaron tres nuevos términos: replicación del ADN, procesado del ARN y síntesis de derivados de aminoácidos. Uno de los términos, replicación del ADN, también se detectó en TIME RP75/59.



**Figura 31.** Términos GO de los genes diferencialmente expresados durante el cuajado partenocárpico del fruto, representados por más de un 2% de genes.

## Resultados

Además, se empleó el programa FatiGO, para determinar que términos GO estaban sobre y sub-representados en el grupo de genes regulados diferencialmente en el cuajado partenocárpico del fruto con respecto al resto de genes representados en el microarray. La mayoría de los términos sobre-representados estaban relacionados con la organización de la cromatina (ensamblaje de cromatina, ensamblaje de complejos ADN-proteína, organización de cromosomas, biogénesis y empaquetado del ADN) (Tabla 11).

**Tabla 11.** Términos GO significativamente sobre o sub-representados en los genes diferencialmente expresados en el cuajado partenocárpico con respecto al resto de genes del microarray.

Proceso biológico	eTIME RP75/59 eRP75/59vsUC82	Microarray	Adj. pvalor	Nivel
Chromatin assembly	24,10%	4,67%	1,71E-005	9
Organelle organization and biogenesis	14,10%	5,75%	1,71E-005	4
Chromatin assembly or disassembly	13,89%	2,66%	1,71E-005	8
Establishment and/or maintenance of chromatin architecture	10,45%	2,24%	3,58E-005	7
Protein-DNA complex assembly	13,19%	2,99%	2,43E-004	8
Chromosome organization and biogenesis (sensu Eukaryota)	6,80%	1,68%	2,70E-004	6
Chromosome organization and biogenesis	6,34%	1,56%	2,70E-004	5
DNA packaging	6,80%	1,68%	2,70E-004	6
Macromolecular complex assembly	14,93%	5,89%	2,65E-003	7
Nucleoside diphosphate metabolic process	1,29%	0,00%	1,54E-002	6

### 3.3 Análisis de genes relacionados con el ciclo celular

En el análisis anterior se detectaron sobretodo términos GO relacionados con la organización de la cromatina, que está estrechamente relacionada con la división celular. Para determinar si esto se debía a diferencias en la regulación del ciclo celular durante el cuajado partenocárpico, se analizaron los genes relacionados con el ciclo celular diferencialmente expresados durante el cuajado partenocárpico con respecto al cuajado normal (Tabla 12).

**Tabla 12.** Expresión de los genes diferencialmente expresados durante el cuajado partenocárpico (eTIME RP75/59 y eUC82vsRP75/59) relacionados con ciclo celular.

<b>Sonda del microarray</b>	<b>Descripción del gen</b>	<b>RP75/59 Ant_E</b>	<b>UC82 Ant_E</b>	<b>RP75/59 3DPA_E</b>	<b>UC82 3DPA_E</b>
<b>Cell division related</b>					
Les.2949.1.S1_at	PCNA2 proliferating cell nuclear antigen 2 (PCNA2)	11,39	9,86	11,98	12,4
LesAffx.67274.1.S1_at	Aurora kinase b	7,04	6,36	7,72	8,29
<b>Cell cycle arrest</b>					
Les.450.1.S1_at	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3	7,78	7,82	8,57	9,34
<b>DNA replication licensing factor</b>					
Les.4978.1.S1_at	DNA replication licensing factor	10,42	9,29	10,89	11,18
Les.5283.1.S1_at	DNA replication licensing factor mcm5	10,54	9,18	10,91	11,2
<b>G2/M transition of mitotic cell cycle</b>					
Les.3713.1.S1_at	Cyclin-dependent kinase	8,36	7,1	10,47	11,32
<b>M phase of meiotic cell cycle</b>					
Les.89.1.S1_at	RAD51	7,44	6,77	8,37	8,98
<b>M phase of mitotic cell cycle</b>					
LesAffx.25483.1.S1_at	Anaphase-promoting complex subunit 11 homolog	9,63	8,93	9,75	10,12
LesAffx.60610.2.S1_at	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	8,63	7,49	11,23	12,24
<b>Regulation of progression through cell cycle</b>					
Les.107.1.S1_at	Cyclin a2	6,14	5,54	7,77	8,54
Les.351.1.S1_at	Cyclin-dependent kinase	8,17	6,98	10,19	11,09
Les.3519.1.S1_at	Cyclin d3-2	10,23	8,99	11,81	12,19
Les.3520.1.S1_at	Cyclin d3-2	11,06	9,68	12,2	12,64
Les.5343.1.S1_at	Cell division control protein 6	7,18	5,95	7,94	8,38
LesAffx.19390.1.S1_at	CCNB2_MEDVAG2 mitotic-specific cyclin-2 (b-like cyclin)	7,14	7,65	8,88	9,79
<b>Replication protein a2</b>					
Les.5740.1.S1_at	Replication protein a2	10,2	8,76	10,85	11,18

## Resultados

Se detectaron 16 genes diferencialmente expresados, todos ellos también estaban regulados durante el desarrollo normal del carpelo (TIME) con un patrón de expresión similar, presentaban un aumento del nivel de expresión a 3DPA (Tabla 9). En cuanto al patrón de expresión en los estadios emasculados, en UC82 el nivel de expresión también aumentó a 3DPA, con respecto a antesis. Sin embargo, en la línea partenocárpica el nivel de expresión de estos genes en antesis es mayor al de la variedad control, y el aumento a 3DPA es más pequeño.

Algunos de estos genes relacionados con ciclo celular, habían sido incluidos en los análisis realizados para verificar los resultados obtenidos con el microarray. Al comparar el patrón de expresión de estos genes obtenido mediante PCR cuantitativa a tiempo real con el del microarray, se observó la misma tendencia (Tabla 13). Como ya se había comentado, todos los genes presentaban un mayor nivel de expresión en la línea partenocárpica durante la antesis, y tras ésta el aumento de expresión a 3DPA era menor en la línea partenocárpica que en el control.

**Tabla 13.** Expresión de genes relacionados con el ciclo celular en la línea partenocárpica con respecto a la variedad normal (RP75/59 / UC82), según PCR cuantitativa a tiempo real (expresión normalizada con respecto a actina y transformada a escala logarítmica), y según el microarray (también en escala logarítmica).

Sonda del microarray	Descripción del gen	Ant_E QPCR	3DPA_E QPCR	Ant_E Array	3DPA_E Array
Les.4978.1.S1_at	DNA replication licensing factor	0,53	-0,53	1,13	-0,29
Les.5343.1.S1_at	Cell division control protein 6	0,24	-0,22	1,23	-0,44
Les.3520.1.S1_at	Cyclin d3-2	1,36	-0,64	1,38	-0,44
Les.2949.1.S1_at	PCNA	0,93	-0,09	1,53	-0,42

### 3.4 Análisis de genes relacionados con hormonas

Las hormonas vegetales están implicadas en el cuajado del fruto, además su concentración se encuentra alterada en los carpelos de algunas variedades partenocárpicas de tomate. Por ello nos planteamos analizar la expresión de los genes relacionados con hormonas. Al estudiar el cuajado partenocárpico del fruto en RP75/59, se detectaron más de 25 genes

relacionados con hormonas, cuya expresión se encontraba alterada con respecto al cuajado normal (Tabla 14).

Se detectaron 12 genes relacionados con auxinas, ninguno de los cuales estaba implicado en el metabolismo de esta hormona. Uno de los genes estaba implicado en el transporte de la hormona, dos en la cascada de señalización, cuatro eran proteínas inducidas por auxina, cinco eran genes relacionados con la respuesta a auxina, y uno estaba relacionado con la respuesta a auxina y etileno.

En cuanto a las giberelinas se detectaron 5 genes diferencialmente expresados. Dos eran GA20-oxidasas, responsables de la síntesis de esta hormona. La GA20-oxidasa 3 estaba claramente activada en RP75/59 con respecto a la variedad control en los dos estadios de desarrollo analizados, aunque en ambas líneas el nivel de expresión era mayor a 3DPA. Sin embargo, la GA20-oxidasa 2, que presentaba un mayor nivel de expresión en la línea partenocárpica durante la antesis, estaba más expresada a 3DPA en la variedad control. Los otros tres genes diferencialmente expresados fueron la GA2-oxidasa, una GASA5-like protein y el gen *DWARF3*.

Entre los genes expresados diferencialmente también había 5 relacionados con el etileno. Un gen relacionado con la síntesis de la hormona la *ACO5*, que presentaba un nivel de expresión mayor durante la antesis en la línea partenocárpica, y otros cuatro genes, relacionados con la detección y respuesta a la hormona, que estaban más activados en la antesis de la variedad normal.

Además, se detectaron 4 genes relacionados con el ácido abscísico, cuyo nivel de expresión fue menor a 3DPA que en antesis en ambas líneas. Sin embargo, el descenso en el nivel de expresión fue más pronunciado en la variedad normal. No se detectó ningún gen relacionado con las citoquininas entre los genes regulados de manera diferente en el cuajado partenocárpico.

## Resultados

**Tabla 14.** Genes diferencialmente expresados durante el cuajado partenocárpico del fruto con respecto al cuajado normal (eTIME RP75/59 y eUC82vsRP75/59) relacionados con hormonas.

Sonda del microarray	Descripción del gen	RP75/59 Ant_E	UC82 Ant_E	RP75/59 3DPA_E	UC82 3DPA_E
<b>AUXINAS</b>					
LesAffx.49488.1.S1_at	Auxin-responsive family protein (signaling)	4,66	5,7	4,17	4,19
Les.3489.1.S1_at	Aminopeptidase p (transport)	10,29	10,42	9,89	9,55
Les.4501.1.S1_at	Auxin-induced protein	4,88	4,91	4,93	6,8
Les.5138.1.S1_at	Auxin-induced protein	10,55	10,38	9,43	10,43
LesAffx.2303.1.S1_at	Highlyauxin-induced protein (aldo keto reductase family)	8,09	8,32	7,41	6,61
Les.4383.1.S1_at	Metallocoarboxypeptidase inhibitor	13,34	11,82	13,89	10,87
Les.3707.1.A1_at	Auxin-responsive protein IAA2	4,49	4,5	4,75	5,34
Les.3707.1.S1_at	Auxin-responsive protein IAA2	4,61	4,45	5,86	8,01
Les.3702.1.S1_at	Auxin-regulated protein IAA10	5,1	4,75	5,75	4,81
Les.5154.1.S1_at	Vesicle-associated membranesynaptobrevin 7b (response)	12,18	12,46	11,76	11,62
Les.5312.1.S1_at	GH3-like protein (response)	8,35	9,65	6,83	7,39
LesAffx.67531.1.S1_at	AXR2IAA7 (response)	4,79	4,08	6,15	8,74
<b>GIBERELINAS</b>					
Les.3625.1.S1_at	GASA5-like protein (induced)	9,97	10,58	9,48	11
LesAffx.9038.1.S1_at	DWARF3 (synthesis-degradation)	12,76	11,39	13,11	12,88
Les.5621.1.S1_at	GA2-oxidase	6,05	6,22	7,41	8,1
Les.63.1.S1_at	GA20-oxidase 3	8,83	5,19	9,04	7,55
Les.65.1.S1_at	GA20-oxidase 2	5,17	4,79	5,67	6,83
<b>ETILENO</b>					
Les.354.1.S1_at	KNAT3 homeodomain protein (detection)	10,41	10,76	9,86	9,33
Les.5917.1.S1_at	ACC oxidase ACO5	6,95	5,2	4,99	4,68
Les.5312.1.S1_at	GH3-like protein (ethylene-dependent resistance)	8,35	9,65	6,83	7,39

**Tabla 14.** Genes diferencialmente expresados durante el cuajado partenocárpico del fruto con respecto al cuajado normal (eTIME RP75/59 y eUC82vsRP75/59) relacionados con hormonas (cont.).

Sonda del microarray	Descripción del gen	RP75/59 Ant_E	UC82 Ant_E	RP75/59 3DPA_E	UC82 3DPA_E
<b>ETILENO</b>					
Les.5841.1.S1_at	3-keto-acyl-thiolase 2 (ethylene-dependent resistance)	10,87	11,59	10,08	10,4
Les.4233.1.S1_at	Universal stress protein family protein (induced)	5,23	7,24	4,82	4,5
<b>ÁCIDO ABSCÍSIKO</b>					
Les.5830.1.S1_at	Protein kinase (signaling)	9,5	9,6	9,36	8,76
LesAffx.8142.1.S1_at	Abscisic acid-induced protein	10,77	10,92	10,43	9,86
Les.4655.1.S1_at	MOSC domain protein	12,04	12,54	10,89	10,59
Les.112.1.S1_at	ABA1 zeaxanthin epoxidase	10,07	11,04	9,19	8,83

#### **4. Construcción y caracterización de una población F2 para la localización de los genes responsables de la partenocarpia de RP75/59**

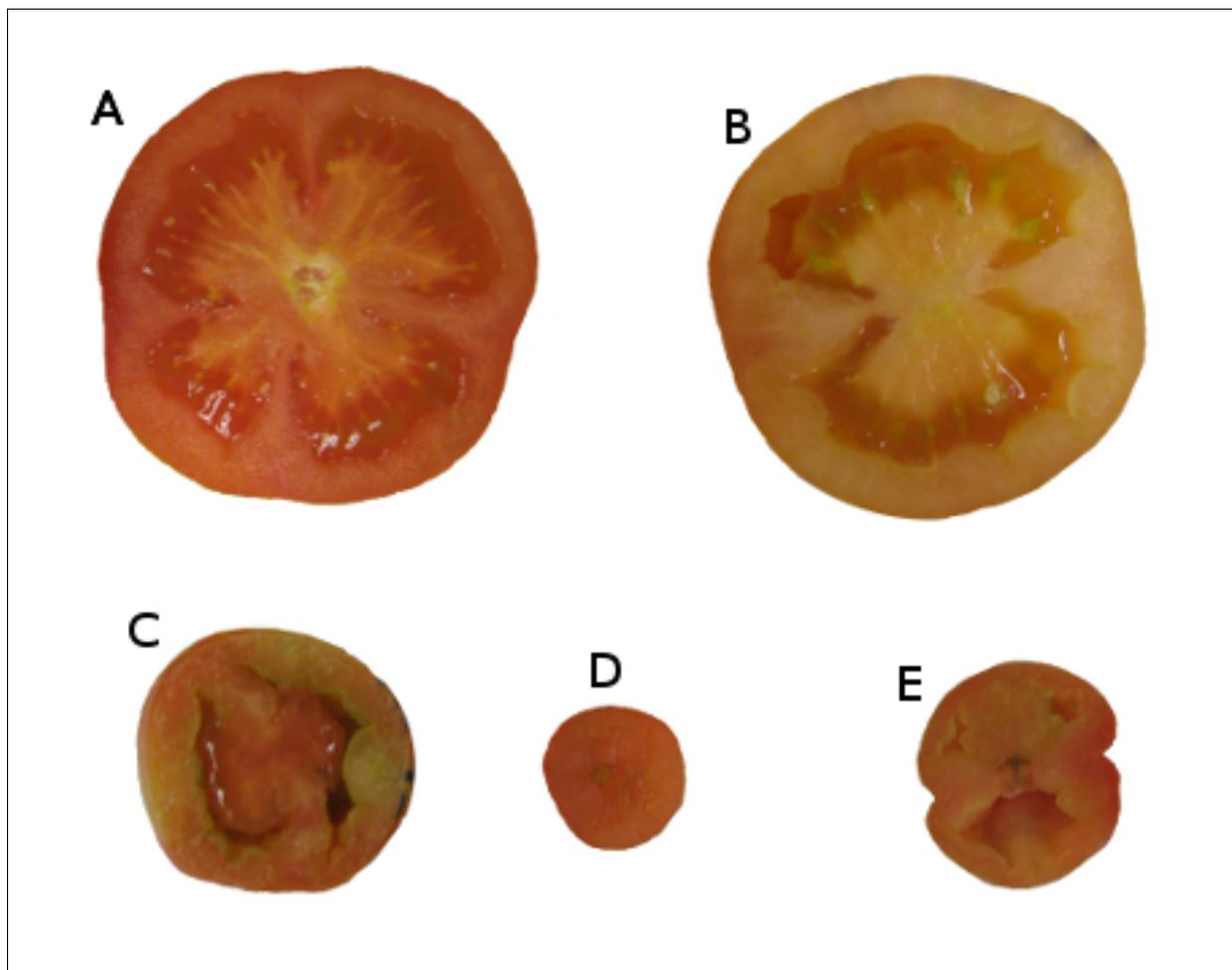
La línea RP75/59, desarrollada a partir de un cruce entre “Atom” x “Bubjekosoko”, es capaz de producir frutos sin semillas de las mismas características morfológicas que los frutos normales. La planta muestra un desarrollo normal de los lóculos en los frutos partenocárpico y no presenta malformaciones en las flores, además, es capaz de producir frutos con semillas cuando las condiciones ambientales lo permiten. Estas características hacen muy interesante este fenotipo para su empleo en programas de mejora. Con objeto de comenzar la localización de los genes responsables de este fenotipo, y comprobar la implicación de los genes candidatos identificados en el análisis del transcriptoma del carpelo, se caracterizó una F2 procedente del cruce de esta línea con la variedad UC82, que es incapaz de producir frutos en ausencia de polinización y fecundación.

##### 4.1 Caracterización de la F2 procedente del cruce UC82 x RP75/59

La caracterización de las plantas se llevó a cabo durante la estación de otoño-invierno en condiciones de invernadero, que permiten la producción de polen viable. Se caracterizaron los parentales (RP75/59 y UC82), la F1 y 142 plantas de la F2. Las plantas se cultivaron a dos guías, una de las cuales se empleó para caracterizar el cuajado en ausencia de polinización, y otra para caracterizar el cuajado tras polinizar manualmente. Se caracterizaron cuatro inflorescencias en cada guía y tres flores por inflorescencia para evitar fenómenos de competencia. Las flores de ambas guías se emascularon entre 4 y 2 días antes de la antesis, y únicamente se polinizaron las de la guía empleada para caracterizar el cuajado tras polinización. Las plantas que no cuajaron frutos en ninguna de las dos guías no se tuvieron en cuenta para los análisis. Finalmente, se pudieron fenotipar 135 plantas de la F2, los parentales y la F1. En ningún caso se encontraron frutos con semillas procedentes de la guía empleada para caracterizar partenocarpia.

La gran mayoría de los frutos se recogieron en el estadio de viraje y rojo maduro. Cuatro meses después de realizar los últimos cruces se recogieron el resto de frutos, aunque no hubieran llegado a ese estadio. En total se caracterizaron 2301 frutos. Se tomaron datos de distintos

caracteres de fruto: la forma (tomando la distancia entre el peciolo y la base del fruto, y el diámetro máximo del fruto), el peso, el desarrollo de los lóculos, del tejido locular y la presencia de semillas o pseudoembriones. Los frutos se clasificaron atendiendo a las características de los lóculos en cinco categorías (Figura 32).



**Figura 32.** Tipos de frutos atendiendo a las características del tejido locular. **A.** Fruto con pseudoembriones. **B.** Fruto con semillas. **C.** Fruto jugoso. **D.** Fruto macizo. **E.** Fruto vacío.

- **Fruto vacío:** aquel fruto en el que no se desarrolló el tejido locular, los lóculos aparecen como cavidades vacías, por lo general estos frutos fueron achatados y acostillados.
- **Fruto macizo:** fruto donde no se distinguían las cavidades locales, en su mayoría eran frutos redondeados de pequeño tamaño.

## Resultados

- **Fruto jugoso:** fruto con desarrollo normal del tejido locular, pero que carecía de semillas, en su mayoría con un tamaño menor al de los frutos con semillas (tamaño medio inferior a 20gr).
- **Fruto con pseudoembriones:** fruto con desarrollo locular normal que presenta unas estructuras pseudoembrionarias en la zona donde normalmente se encuentran las semillas, en su mayoría de un tamaño similar a los frutos con semillas (tamaño medio superior a 20gr).
- **Fruto con semillas:** fruto con desarrollo locular normal que contienen semillas.

### 4.2 Clasificación de las plantas de la F2 atendiendo a las características de los frutos

El Anexo 9 contiene los datos de cada planta para la guía de frutos emasculados y no polinizados: el porcentaje de cuajado, el porcentaje de cada tipo de fruto producido y la media de peso y forma de los frutos. Para realizar una clasificación no discreta de las plantas se realizó un análisis de componentes principales (PCA), se ordenaron las plantas en función de las características de los frutos producidos en ausencia de polinización y fecundación. Los caracteres empleados fueron: porcentaje de frutos cuajados, porcentaje de frutos de cada tipo producidos, peso medio del fruto (excluyendo los frutos que no estaban maduros) y forma media del fruto (diámetro/altura, excluyendo los frutos que no estaban maduros). Los dos primeros ejes del PCA representaban un 59,72% de la variabilidad de los datos (Tabla 15).

**Tabla 15.** Porcentaje de variación de los datos explicado mediante el análisis de componentes principales.

<b>EigenValues</b>	<b>EV</b>	<b>Variación</b>	<b>Variación acumulada</b>
EV-1	2,56	36,52%	36,53%
EV-2	1,62	23,20%	59,72%
EV-3	1,27	18,21%	77,93%
EV-4	0,82	11,71%	89,64%
EV-5	0,42	5,98%	95,62%
EV-6	0,19	2,68%	98,30%
EV-7	0,12	1,70%	100,00%

Al representar los datos en función de los valores para los vectores PC-1 y PC-2 (Tabla 16) se observó que los parentales se situaban en extremos opuestos de la gráfica. Sin embargo, las plantas de la F2 no se distribuían en grupos discretos sino que formaban una nube de puntos entre ambos parentales (Figura 33).

**Tabla 16.** Componentes principales

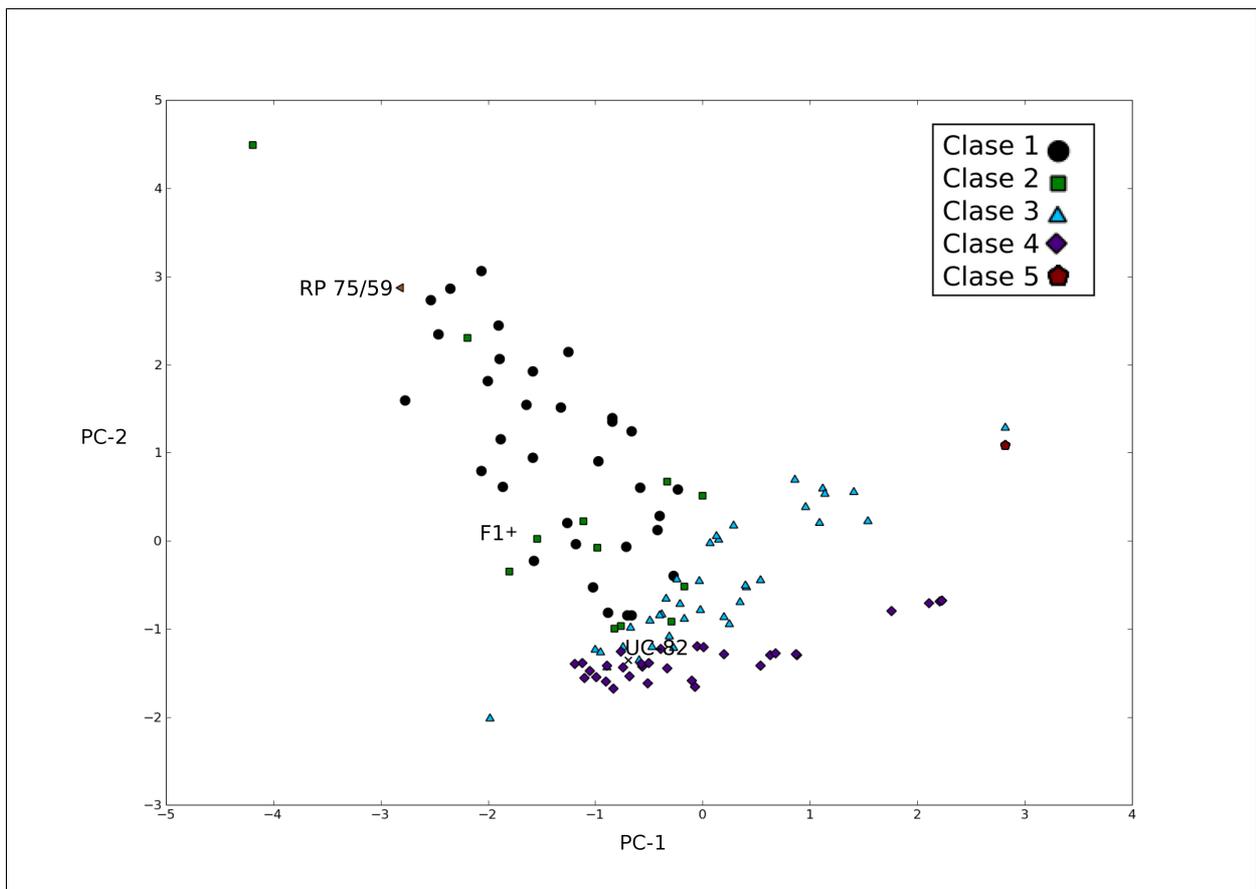
<b>Variables</b>	<b>pc-1</b>	<b>pc-2</b>	<b>pc-3</b>	<b>pc-4</b>	<b>pc-5</b>	<b>pc-6</b>	<b>pc-7</b>
% cuajado	-0,5	-0,13	0,14	-0,22	0,78	-0,14	-0,17
% partenocárpico	-0,31	0,46	-0,11	-0,66	-0,15	0,26	0,4
% jugosos	-0,3	0,42	-0,15	0,7	0,22	0,32	0,26
% macizos	0,03	0,07	0,86	0,09	-0,04	-0,2	0,45
% vacíos	-0,19	-0,68	-0,28	0,05	-0,03	-0,02	0,64
Peso medio	-0,55	0,14	-0,12	0,14	-0,42	-0,68	-0,12
Forma media	-0,47	-0,32	0,33	0,04	-0,37	0,56	-0,34

Con objeto de clarificar los resultados del PCA se realizó una clasificación preliminar de las plantas, en función del tipo de frutos que eran capaces de producir tras ser emasculadas y en ausencia de polinización:

- CLASE 1: Plantas capaces de producir algún **fruto con pseudoembriones**, con independencia de su capacidad para producir otros tipos de frutos. En esta clase se agruparon 33 plantas de la F2, RP75/59 y la F1.
- CLASE 2: Plantas incapaces de producir **frutos con pseudoembriones**, pero capaces de producir algún **fruto jugoso**. Aquí se incluyeron 12 plantas de la F2.
- CLASE 3: Plantas incapaces de producir **frutos con pseudoembriones** y **jugosos**, pero capaces de producir al menos un **fruto macizo**. Este grupo incluyó 37 plantas de la F2.
- CLASE 4: Plantas incapaces de producir **frutos con pseudoembriones**, **jugosos** y **macizos**, pero capaces de producir **frutos vacíos**. Incluyó 32 plantas de la F2 y UC82.
- CLASE 5: Plantas que no produjeron ningún fruto en la guía emasculada. Únicamente produjeron **frutos con semillas** en la guía en la que las flores fueron polinizadas manualmente. Aquí se agruparon 21 plantas de la F2.

## Resultados

Una vez clasificadas las 135 plantas de la F2, se representaron los datos indicando la clase fenotípica a la que pertenecían las plantas en el PCA (Figura 33). En esta representación se observó que el parental partenocárpico se situó en la parte superior izquierda del PCA, el parental no partenocárpico en la parte inferior algo más hacia la derecha y la F1 en una zona intermedia entre ambos parentales, algo más cerca del parental no partenocárpico. En cuanto a las plantas de la F2 forman una nube de puntos continua entre ambos parentales.



**Figura 33.** Representación gráfica del resultado del análisis PCA. El eje X corresponde a la primera coordenada y el eje Y a la segunda.

Sin embargo, a pesar de la ausencia de grupos discretos, las plantas de cada una de las clases fenotípicas se situaron en zonas diferentes en la representación gráfica. Las plantas de la clase 1, capaces de producir frutos con pseudoembriones, se situaron desde el parental partenocárpico hacia abajo, las plantas de la clase 2, que producen frutos jugoso, se situaron mezcladas con las de la clase 1 pero más hacia abajo en el PCA. Las plantas de la clase 3,

capaces de producir frutos macizos, se situaron más abajo y a la izquierda que las clases anteriores. Las plantas de la clase 4, que únicamente producían frutos vacíos, se situaron en la zona inferior donde se encontraba situado el parental no partenocárpico. Por último, las plantas de la clase 5, que únicamente eran capaces de producir frutos con semillas y no produjeron ningún fruto en la guía empleada para caracterizar partenocarpia, se situaron todas juntas en la zona más a la derecha del PCA, al tener todas las variables estudiadas en este análisis valor cero.

#### 4.3 Correlación del fenotipo de la F2 con la expresión génica

Para determinar si existía alguna relación entre el transcriptoma de la flor y la clase fenotípica de la planta se analizó la expresión génica en plantas de la F2. Primero, se seleccionaron genes cuya expresión en el carpelo en dos parentales fue diferente de acuerdo con el análisis realizado con el GeneChip Tomato Array de Affymetrix. En total se seleccionaron 11 genes, que se expresaban diferencialmente, y cuya función sugería una posible relación con el proceso de cuajado del fruto. Se incluyeron: cinco factores de transcripción, dos genes relacionados con el ciclo celular, dos genes implicados en la síntesis de giberelinas, un gen implicado en la síntesis de etileno y un gen relacionado con la respuesta a auxinas (Tabla 18). Después, se caracterizó la expresión de estos genes en flor entera en el estadio de antesis. Se empleó flor entera en lugar de carpelo debido a la cantidad de material de partida necesario para realizar los análisis. Se comprobó la expresión en 16 plantas de la F2 pertenecientes a las cinco clases fenotípicas (Tabla 17), en la F1 y en los parentales. Por último, el nivel de expresión de estos genes se normalizó empleando la actina como gen de referencia.

**Tabla 17.** Plantas de la F2 en las que se comprobó la expresión de los genes seleccionados.

<b>Clase 1</b>	<b>Clase 2</b>	<b>Clase 3</b>	<b>Clase 4</b>	<b>Clase 5</b>
F2_127	F2_122	F2_110	F2-102	F2_24
F2_142	F2_103	F2_121	F2_118	F2_15
F2_99		F2_113	F2_106	F2_36
F2_76		F2_138		

## Resultados

**Tabla 18.** Expresión en el carpelo durante el cuajado según el GeneChip Tomato Array de los genes probados mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

Sonda del microarray	Descripción del gen	UC82 Ant_E	RP75/59 Ant_E	UC82 3DPA_E	RP75/59 3DPA_E
Les.3520.1.S1_at	Cyclin d3-2	9,68	11,06	12,64	12,2
Les.2949.1.S1_at	PCNA	9,86	11,39	12,4	11,98
LesAffx.67531.1.S1_at	Auxin-resistance protein 2	4,08	4,79	8,74	6,15
Les.5917.1.S1_at	ACC oxidase	5,2	6,95	4,68	4,99
Les.63.1.S1_at	Gibberellin 20-oxidase 3	5,19	8,83	7,55	9,04
Les.65.1.S1_at	Gibberellin 20-oxidase 2	4,79	5,17	6,83	5,67
Les.2902.1.S1_at	MADS-box transcription factor pistillata	8,2	6,86	6,13	5,38
Les.3780.1.S1_at	Agamous-like protein	11,18	10,28	9,87	9,97
Les.5885.1.A1_at	RAP2.4 encodes a member of the DREB subfamily A-6 of ERF/AP2 transcription factor family	11,99	12,21	10,93	11,7
Les.5941.1.A1_at	ATHB-15 (incurvata 4) dna binding transcription factor	7,69	8,17	9,26	8,9
LesAffx.4763.1.S1_at	Embryonic abundant protein related	10,1	10,96	10,84	11,59

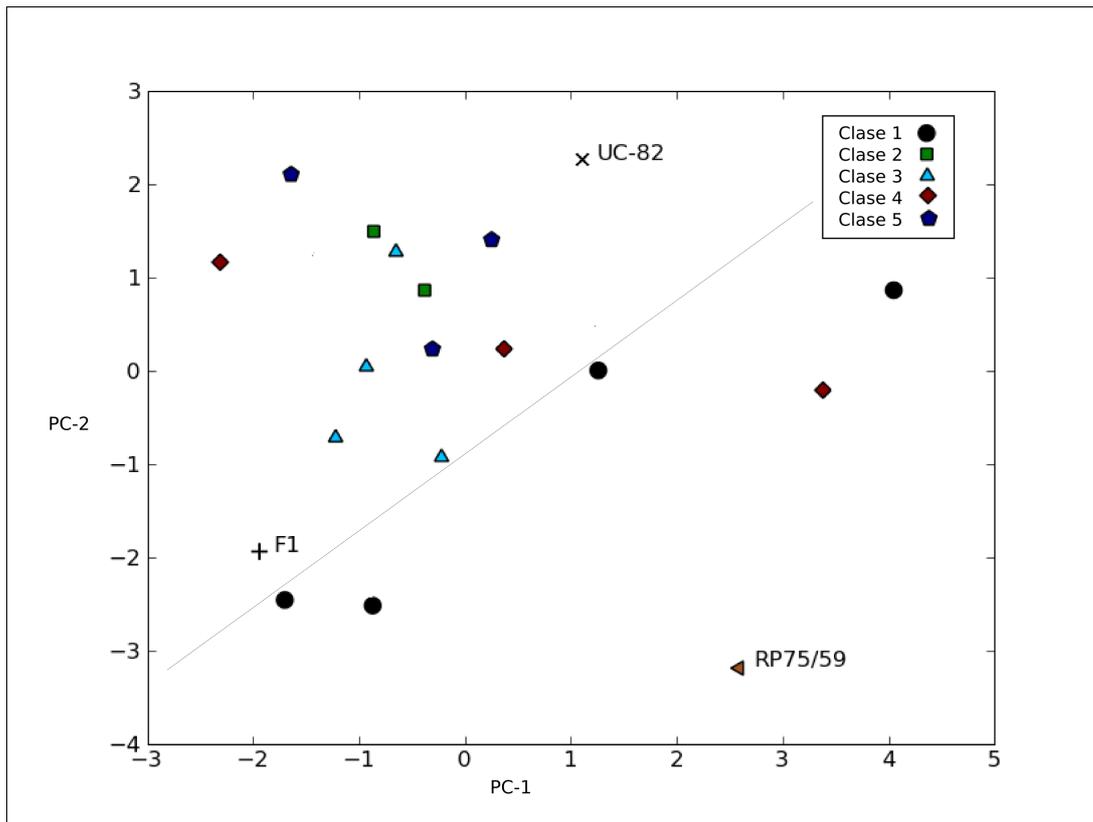
Cuando se analizó la expresión de estos genes en las plantas de la F2 no se observó ninguna correlación clara entre el nivel de expresión de ningún gen y el fenotipo. Esto podría ser debido a varios factores. Por un lado los análisis en el microarray se realizaron a partir del carpelo, y en este análisis se está partiendo de flor entera que incluye tejidos muy diversos. Además, como se observa en el PCA realizado a partir de los datos fenotípicos (Figura 33), las clases fenotípicas de la F2 no presentan una separación tan clara como los parentales. Por ello, se realizó un análisis PCA en base al nivel de expresión de los 11 genes analizados. Los dos primeros ejes del PCA representaban un 52,09% de la variabilidad de los datos (Tabla 19). Igual que ya ocurría en el PCA anterior, al representar los datos en función de los valores para estos los vectores PC1 y PC2 (Tabla 20), no se observaron grupos discretos, sino una nube de puntos con los parentales situados en extremos opuestos. Para clarificar el resultado se representaron los datos indicando la clase fenotípica a la que pertenecían las plantas (Figura 34).

**Tabla 19.** Porcentaje de variación de los datos explicada mediante el análisis de componentes principales.

<b>Eigen Values</b>	<b>EV</b>	<b>Variación</b>	<b>Variación acumulada</b>
EV-1	3,16	28,74%	28,74%
EV-2	2,57	23,35%	52,09%
EV-3	1,27	11,51%	63,61%
EV-4	1,01	9,21%	72,81%
EV-5	0,89	8,12%	80,93%
EV-6	0,71	6,50%	87,43%
EV-7	0,51	4,62%	92,05%
EV-8	0,37	3,33%	95,38%
EV-9	0,32	2,90%	98,28%
EV-10	0,12	1,13%	99,41%
EV-11	0,06	0,59%	100,00%

**Tabla 20.** Componentes principales.

<b>Variables</b>	<b>pc-1</b>	<b>pc-2</b>	<b>pc-3</b>	<b>pc-4</b>	<b>pc-5</b>	<b>pc-6</b>	<b>pc-7</b>	<b>pc-8</b>	<b>pc-9</b>	<b>pc-10</b>	<b>pc-11</b>
Les.63.1.S1_at	0,4	-0,27	0,09	0,38	-0,05	0,24	0,25	-0,12	0,17	-0,62	-0,26
Les.65.1.S1_at	0,34	-0,24	0,14	0,28	0,47	0,4	-0,2	-0,11	-0,21	0,39	0,3
Les.5917.1.S1_at	0,31	0,32	-0,33	0,24	-0,16	-0,16	0,49	-0,25	0,29	0,31	0,32
Les.3520.1.S1_at	0,4	-0,16	-0,09	-0,02	-0,55	-0,17	-0,22	-0,21	-0,47	0,24	-0,32
LesAffx.67531.1.S1_at	0,26	0,2	0,44	0,2	0,12	-0,63	-0,41	-0,06	0,2	-0,14	0,14
Les.2949.1.S1_at	0,36	-0,27	-0,31	-0,16	-0,15	0,03	-0,27	0,63	0,4	0,05	0,14
Les.2902.1.S1_at	0,14	0,43	-0,42	0,06	0,42	0,06	-0,26	-0,04	0,1	0,05	-0,59
Les.3780.1.S1_at	0,35	0,35	-0,15	-0,34	0,14	0,01	0,09	0,15	-0,51	-0,43	0,34
Les.5885.1.A1_at	0,2	0,34	0,55	-0,01	-0,09	0,17	0,33	0,48	-0,03	0,29	-0,29
Les.5941.1.A1_at	0,27	-0,13	0,21	-0,73	0,14	0,07	0,08	-0,42	0,33	0,08	-0,09
LesAffx.4763.1.S1_at	-0,05	0,43	0,11	0,03	-0,44	0,55	-0,43	-0,2	0,2	-0,11	0,2



**Figura 34.** Representación gráfica del resultado del análisis PCA. El eje X corresponde a la primera coordenada y el eje Y a la segunda.

Al analizar la representación gráfica (Figura 34) podemos observar que, los parentales se situaron en extremos opuestos, la F1 se situó entre ambos, y las plantas de la F2 formaron una nube de puntos. Las plantas de la clase 1 se situaron en la zona inferior hacia la izquierda, más próximas al parental partenocárpico, y el resto de plantas se situaron más hacia arriba, entre la F1 y el parental no partenocárpico. La planta F2\_102 perteneciente a la clase 4 se situó junto a las plantas pertenecientes a la clase 1.

#### 4.4 Ajustes de los datos a los diferentes modelos genéticos descritos

La partenocarpia en RP75/59 ha sido estudiada por diversos grupos y se han propuesto diferentes modelos genéticos para explicar la herencia de este carácter. Philouze (1989) propuso que la partenocarpia en esta línea estaba controlada por entre 3 y 5 genes recesivos independientes con efecto acumulativo. Vardy y colaboradores (1989a) propusieron un modelo

de tres genes independientes. Nuez y colaboradores (1986) propusieron un modelo de dos genes independientes.

Para determinar que modelo genético se ajusta más a nuestros datos, se analizó la segregación de la F2 procedente del cruce entre RP75/59 y un parental no partenocárpico. Al analizar los frutos de la F2 se describieron 5 clases fenotípicas en función del tipo de frutos producidos. Sin embargo, los modelos existentes únicamente proponen dos clases fenotípicas, siendo partenocárpicas las plantas capaces de producir frutos con las mismas características que los frutos con semillas. Siguiendo esta definición se consideraron equivalentes a plantas partenocárpicas las plantas de la clase 1, puesto que son las únicas capaces de producir frutos con desarrollo normal de los lóculos y con frutos de tamaño similar a los frutos con semillas (el tamaño medio de los frutos es superior a 20gr). Las plantas de la clase 2, aunque también producen frutos con desarrollo normal de los lóculos, no se incluyeron entre las plantas partenocárpicas, puesto que los frutos que producen son de menor tamaño que los frutos con semillas (tamaño medio inferior a 20gr).

#### *4.4.1 Ajuste al modelo de Vardy y colaboradores*

Vardy y colaboradores (1989a) estudiaron la heredabilidad de la partenocarpia procedente de RP75/59 en condiciones de bajas temperaturas, que únicamente permiten el cuajado de frutos sin semillas. Los autores propusieron un modelo basado en la acción de tres genes recesivos independientes con efectos aditivos. Todos los genes tendrían igual peso, y la presencia de cuatro alelos de partenocarpia sería suficiente para inducir desarrollo partenocárpico del fruto. En las plantas partenocárpicas la presencia de un número mayor o menor de alelos de partenocarpia afectaría al porcentaje de cuajado.

Según este modelo, para una F2 desarrollada a partir de un parental homocigoto para los tres alelos de partenocarpia (RP75/59) y un parental homocigoto para los tres alelos de no partenocarpia se esperaría una relación 11:21 de plantas partenocárpicas y no partenocárpicas (Tabla 21).

## Resultados

**Tabla 21.** Proporciones esperadas en una generación F2 según el modelo de Vardy. **P** plantas capaces de producir frutos sin semillas y **np** plantas no partenocárpicas.

Alelos de partenocarpia	Frecuencia en la F2	Fenotipo
0	1/64	np
1	6/64	np
2	15/64	np
3	20/64	np
4	15/64	P
5	6/64	P
6	1/64	P

Al comparar las frecuencias esperadas según el modelo de Vardy con el porcentaje de plantas partenocárpicas y no partenocárpicas en la F2 (Tabla 22) se obtuvo un valor de  $\chi^2$  5,72. Este valor es superior al que nos da una probabilidad del 5% de que los datos experimentales se hayan desviado simplemente por azar (3,84), lo que indica que los datos son significativamente diferentes a lo esperado.

**Tabla 22.** Análisis estadístico para el modelo de Vardy.

Fenotipo	Observados	Esperados
Partenocárpicas	33	46
No partenocárpicas	102	89
Total	135	135

### 4.4.2 Ajuste al modelo de Nuez y colaboradores

Nuez y colaboradores (1986) propusieron un modelo para la habilidad de cuajar frutos sin semillas en RP75/59 basado en la acción de dos genes independientes parcialmente recesivos. De manera que, las plantas heterocigotas *pat-3+* *pat-4+* no son capaces de producir frutos partenocárpicos, pero las plantas homocigotas para uno de los dos genes y heterocigotas para el otro si poseen capacidad partenocárpica.

Según este modelo, para una F2 desarrollada a partir de un parental homocigoto para

los alelos de partenocarpia y un parental homocigoto por los alelos de no partenocarpia se esperaría una relación 5:11 de plantas partenocárpicas y no partenocárpicas (Tabla 23).

**Tabla 23.** Proporciones esperadas en una generación F2 según el modelo de Nuez. **P** plantas capaces de producir frutos sin semillas y **np** plantas no partenocárpicas.

Alelos de partenocarpia	Frecuencia en la F2	Fenotipo
0	1/16	np
1	4/16	np
2	6/16	np
3	4/16	P
4	1/16	P

Al comparar las frecuencias esperadas según el modelo de Nuez con el porcentaje de plantas partenocárpicas y no partenocárpicas en la F2 (Tabla 24) se obtuvo un valor de  $\chi^2$  2,92. Este valor es inferior al que nos da una probabilidad del 5% de que los datos experimentales se hayan desviado simplemente por azar (3,84), lo que indica que los datos no son significativamente diferentes a lo esperado.

**Tabla 24.** Análisis estadístico para el modelo de Nuez.

Fenotipo	Observados	Esperados
Partenocárpicas	33	42
No partenocárpicas	102	93
Total	135	135

A pesar de que el modelo de dos genes parcialmente recesivos es el más adecuado presenta un problema. Al analizar la producción de frutos en la F1 emasculando las flores, esta planta fue capaz de producir un fruto partenocárpico con desarrollo normal de los lóculos. Este hecho probablemente se debe a que la partenocarpia está muy influenciada por las condiciones ambientales. Por lo que, al ser ambos genes parcialmente recesivos, en condiciones ambientales favorables y en ausencia de competencia con otros frutos, los dobles heterocigotos podrían ser capaces de producir un bajo porcentaje de frutos partenocárpicos.



## **V. DISCUSIÓN**



El cuajado del fruto es uno de los procesos más importantes del desarrollo vegetal, de él dependen la reproducción y propagación de la planta, cuando se trata de especies silvestres, y la producción, en el caso de las especies cultivadas. El estudio de los genes regulados durante este proceso es crucial para comprender mejor los mecanismos implicados y mejorar el cuajado, especialmente en condiciones ambientales adversas. En este sentido el estudio de materiales con capacidad partenocárpica tiene especial interés, facilita el estudio del cuajado sin interferencia de los procesos relacionados con el desarrollo del embrión, y posibilita el estudio de los estadios tempranos independientemente de la polinización. El tomate es la especie modelo para el estudio del desarrollo de frutos carnosos. A pesar de la gran importancia del cuajado la mayoría de estudios realizados en esta especie se han centrado en el análisis del proceso de maduración (Giovannoni, 2004; Fei *et al*, 2004; Lemaire-chamley *et al*, 2005; Faurobert *et al*, 2007; Martinelli *et al*, 2009). Tan solo en los estudios más recientes se ha abordado el estudio de las primeras fases de desarrollo del fruto (Pascual *et al*, 2007, 2009; Vriezen *et al*, 2008; Wang *et al*, 2009).

Por ello esta tesis se ha centrado en el estudio del cuajado del fruto. Con este enfoque se ha conseguido identificar genes implicados en el cuajado del fruto en la especie modelo *Arabidopsis*, además, se ha comprobado que alrededor de un 75% de los genes aislados son extrapolables a otras especies como tomate. Hecho que tiene especial relevancia, puesto que para la gran mayoría de especies cultivadas no hay disponibles tantos recursos moleculares como para las especies modelo. Por otro lado, se ha diseccionado a nivel transcriptómico el cuajado partenocárpico del fruto en tomate, identificándose 758 genes implicados. Estos datos podrán ser extrapolados a otras especies y serán muy útiles a la hora de mejorar el cuajado en condiciones adversas. Por último, el análisis de la generación F2 desarrollada a partir de las líneas RP75/59 y UC82 ha permitido clarificar la genética de la partenocarpia en RP75/59. Además, esta población servirá de base para realizar el cartografiado e identificación de genes implicados, en el control de este carácter, y en el cuajado y desarrollo del fruto.

## 1. Aislamiento de genes implicados en el cuajado del fruto en especies modelo

Con objeto de mejorar el conocimiento acerca de los procesos biológicos implicados en el cuajado del fruto, se aislaron genes implicados en este proceso en las especies modelo tomate y *Arabidopsis* (Pascual *et al*, 2007). Al estudiar los genes aislados, se comprobó que incluían genes relacionados con funciones como la respuesta a hormonas, que habían sido previamente relacionados con el cuajado del fruto, pero también, genes desconocidos, que constituyen una valiosa fuente de información para futuros estudios acerca del cuajado. Además, se realizó un estudio de conservación entre ambas especies y se encontró un alto grado de correlación, superior al 75%, lo que demuestra que existen una serie de mecanismos generales implicados en el cuajado del fruto en dicotiledóneas.

### 1.1 Sustracción de genotecas en flores de tomate

El aislamiento de genes implicados en el cuajado del fruto en tomate se realizó mediante la técnica de sustracción de genotecas, este procedimiento se empleó para desarrollar una librería de flores enriquecida en genes expresados a 3DPA, momento en que se reanuda la división celular. Tras la secuenciación de la librería se identificaron 181 transcritos distintos. Esta genoteca contiene tanto transcritos de genes expresados diferencialmente a 3DPA, como genes no diferenciales. El análisis de los transcritos identificados desveló la gran cantidad de genes de diversas rutas metabólicas expresados durante el cuajado, como: biosíntesis de proteínas, ensamblaje de nucleosomas, histonas, ensamblaje y desensamblaje de la cromatina, organización de los cromosomas, respuestas de defensa, respuestas al calor, ciclo celular, etc.

Habitualmente para seleccionar los genes que se expresan diferencialmente se tiene en cuenta el número de clones que representan cada transcrito. Sin embargo, en nuestro caso, la mayoría de transcritos estaban representados por un único clon, por lo que no se pudo seleccionar únicamente en base al número de clones. Para solucionar el problema nos planteamos la posibilidad de seleccionar los genes diferenciales en función de su expresión en la especie modelo *Arabidopsis*. De todos los genes representados en nuestra genoteca se pudo identificar el ortólogo de *Arabidopsis* para 32, siete de los cuales se expresaban diferencialmente en

*Arabidopsis* según los datos generados por Schmid y colaboradores (2005). A continuación, se caracterizó la expresión de cinco de estos genes y se comprobó que todos ellos se expresaban diferencialmente.

En total se comprobó la expresión diferencial de 14 de los genes seleccionados, en base al número de clones, o mediante el análisis comparativo con *Arabidopsis*, 11 de los genes mostraban un aumento del nivel de expresión a 3DPA con respecto a antesis. Este resultado confirma la efectividad de la técnica y muestra la escasa redundancia de la sustracción, puesto que se ha comprobado la expresión diferencial de 6 genes que estaban representados por un único clon. Por todo ello, la genoteca construida constituye una fuente fiable de genes implicados en el cuajado, además, el número de genes aislados puede aumentarse mediante la secuenciación de un mayor número de clones de esta genoteca.

## 1.2 Aislamiento de genes expresados diferencialmente en tomate usando la ortología con *Arabidopsis*

Al comprobar que la expresión génica en *Arabidopsis* constituía un criterio de selección válido para determinar cuales de los genes representados en la genoteca estaban diferencialmente expresados, se decidió emplear los datos de *Arabidopsis* para aislar genes relacionados con el cuajado en tomate. A partir de los datos de hibridaciones de microarrays de ADN generados por Schmid y colaboradores (2005) para el proyecto AtGenExpress, se seleccionaron las hibridaciones que incluían los estadios relacionados con el final del desarrollo del carpelo y el cuajado del fruto, y se identificaron los genes regulados a lo largo de este proceso. En total se detectaron 1879 genes diferenciales, un 8,3% de los genes representados en el microarray.

Para extrapolar estos resultados a tomate se identificaron los ortólogos entre tomate y *Arabidopsis*. Éste resultó ser el paso limitante del análisis, puesto que únicamente se pudo asignar inequívocamente ortólogo a 450 de los 1879 genes aislados. La asignación de ortólogos se podría mejorar empleando otras aproximaciones, como análisis filogenéticos. Sin embargo, para poder realizar este tipo de análisis es necesario tener secuenciado el genoma completo de varias especies, puesto que a lo largo del genoma existen genes duplicados y familias génicas con

## Discusión

distinto número de miembros en función de la especie. También se podría aumentar el número de ortólogos apoyándonos no sólo en datos de secuencia, sino también en datos de expresión génica en tomate (Fei *et al*, 2006). En cualquier caso, conforme avanza el proyecto de secuenciación del genoma del tomate se va disponiendo de más secuencias lo que permitirá aumentar el número de ortólogos entre ambas especies. También, se podría aumentar el número de genes aislados siendo menos estrictos a la hora de identificar los genes diferenciales en *Arabidopsis*. Por ejemplo, se podrían exigir diferencias del doble en el nivel de expresión entre estadios, en vez de exigir diferencias de 4 veces, que fue el criterio empleado tanto en tomate como en *Arabidopsis*. Se empleó un criterio tan restrictivo porque se quería determinar el grado de conservación de manera inequívoca, a pesar de estar comparando datos generados por dos técnicas experimentales diferentes.

Una vez identificados los genes ortólogos en ambas especies, se analizó la expresión de estos genes en tomate para determinar el grado de conservación. Primero, se analizaron los patrones de expresión de estos genes en *Arabidopsis* mediante un análisis cluster, que permitió agrupar los genes en siete grupos en función de los niveles de expresión. Luego, se seleccionaron al azar un 10% de los genes de cada grupo, para tener una representación de todos los patrones de expresión existentes. Por último, se caracterizó el patrón de los genes seleccionados durante el cuajado del fruto en tomate mediante PCR cuantitativa. Un 78% de los genes estaban expresados diferencialmente en tomate. Cuando realizamos la misma comprobación empleando genes constantes en *Arabidopsis* obtuvimos un resultado similar, el 75% de los genes caracterizados no variaban tampoco en tomate. Este resultado reafirma el obtenido al analizar los genes variables y demuestra que es posible extrapolar datos de *Arabidopsis* para estudiar el cuajado del fruto en otras especies. Además, deja patente el alto grado de conservación de los genes implicados en el cuajado del fruto en ambas especies.

Cuando analizamos el porcentaje de conservación en función del patrón de expresión de los genes en *Arabidopsis* no se observó ningún sesgo. El porcentaje de conservación era similar en los 7 grupos formados en función del nivel de expresión en *Arabidopsis*. Sin embargo, a pesar de existir un alto porcentaje de conservación, no se encontró ninguna correlación entre el patrón de expresión de los genes en ambas especies. Es más, al analizar la expresión en tomate se

encontraron tanto genes activados como inhibidos en todos los clusters. Esta falta de correlación podría ser debida a la dificultad en determinar la equivalencia entre estadios, se analizaron 3 estadios de *Arabidopsis* y 10 en tomate, además, ambas especies no se desarrollan a la misma velocidad. Por ejemplo, en *Arabidopsis* el embrión alcanza los estadios globular y corazón temprano a los 4 o 5 DPA (Western *et al*, 2001), sin embargo en tomate estos estadios no se alcanzan hasta 12 o 15 DPA (Smith, 1935). Por otro lado, hay que tener en cuenta que el análisis se centró en procesos de desarrollo complejos en los que se encuentran implicados diversos tipos de tejidos, cuyo patrón de desarrollo es independiente, como son el pericarpio y el embrión. Además, la coordinación temporal y espacial de ambos procesos puede diferir entre especies. Tampoco debemos olvidar que los datos obtenidos en *Arabidopsis* proceden del estudio del transcriptoma mediante el empleo de microarrays de DNA, que es una técnica semicuantitativa muy diferente a la PCR cuantitativa en tiempo real.

En cualquier caso, el alto porcentaje de conservación de genes diferenciales muestra que en el cuajado del fruto de tomate y *Arabidopsis* están participando los mismos genes, y que las diferencias observadas a nivel macroscópico entre ambas especies serían consecuencia más de diferencias en la regulación temporal y espacial de los genes y rutas metabólicas implicadas, que de la acción de genes y rutas diferentes. Con esta aproximación se han detectado más de 400 genes diferencialmente expresados durante el cuajado de tomate. Lo que valida el procedimiento utilizado y deja patente su utilidad para extrapolar datos de las especies modelo, hecho especialmente útil al trabajar con especies para las que no se dispone de microarrays, como es el caso de muchas especies cultivadas.

### 1.3 Análisis funcional de los genes diferencialmente expresados

Se realizó un análisis funcional de los genes aislados tanto en tomate como en *Arabidopsis* para determinar las distintas rutas implicadas en el cuajado del fruto. Se detectaron términos GO comunes entre ambas especies como: biosíntesis de proteínas, respuesta al calor, repuesta a estrés y ciclo celular. Pero entre los genes de la librería también se detectaron otros términos, relacionados con la función de las histonas, la fotosíntesis y otros procesos que no se detectaron al analizar los genes aislados en *Arabidopsis*. Sin embargo, no debemos olvidar que la

## Discusión

librería se construyó realizando una sustracción a partir de dos estadios de flor completa, mientras que los análisis de los datos de *Arabidopsis* se centraron en diversos estadios del desarrollo del carpelo, por lo que es de esperar que existan diferencias entre ambos análisis. Además, para analizar los términos GO presentes en los genes de la genoteca no se pudo emplear ningún análisis estadístico debido al pequeño tamaño muestral. De hecho, cuando comparamos los análisis realizados mediante el programa Babelomics (Al-Shahour *et al*, 2006) para genes aislados en *Arabidopsis* y los genes con ortólogos, se observaron algunas diferencias que claramente eran debidas a diferencias en el tamaño muestral que afectan a la potencia de los tests estadísticos realizados.

Finalmente, al integrar los análisis realizados en ambas especies se detectaron un gran número de rutas reguladas a lo largo del cuajado del fruto como: repuesta a estímulos hormonales, modificación de pared celular, fotosíntesis, regulación de la transcripción, transporte de lípidos, envejecimiento, etc. La respuesta a hormonas como la giberelinas, auxinas, ácido jasmónico y ácido abscísico ya había sido relacionada con el cuajado y desarrollo del fruto en tomate (Srivastava y Handa, 2005). También se detectaron otros procesos que ya habían sido relacionados con el cuajado como: ciclo celular y modificación de pared celular (Srivastava y Handa, 2005) y fotosíntesis (Farineau y Lavalmartin 1977), así como procesos que habían sido relacionados con otras fases del desarrollo del fruto como: respuesta a diversos estímulos y estreses (Faurobert *et al*, 2007 y Fei *et al*, 2004). Además, se detectó un enriquecimiento en factores de transcripción probablemente debido al comienzo de la transformación de los tejidos del carpelo en un fruto. Los genes aislados incluyen también genes cuyo papel exacto en el cuajado del fruto aún esta por determinar. Por lo que constituyen una fuente de información muy útil para realizar futuros estudios acerca de los genes implicados en el cuajado en las dicotiledóneas.

## **2. Análisis del transcriptoma del carpelo de líneas partenocárpicas y no partenocárpicas de tomate**

Para seguir profundizando en el estudio de los genes implicados en el cuajado del fruto y entender mejor los mecanismos exactos implicados en el desarrollo del carpelo se realizó un

análisis transcriptómico del carpelo mediante microarrays en tomate. Se empleó una variedad control, en la que se analizaron el proceso de desarrollo del carpelo, cuajado del fruto y fecundación de manera conjunta, y una línea partenocárpica, donde el proceso de cuajado del fruto está desacoplado del proceso de fecundación y desarrollo de la semilla, lo que permite estudiar el cuajado de manera independiente (Pascual *et al*, 2007). Mediante el análisis funcional del transcriptoma se han determinado las funciones biológicas implicadas en el cuajado, muchas de las cuales ya habían sido encontradas en el análisis realizado en *Arabidopsis*, pero además, se ha conseguido identificar nuevos genes relacionados con la síntesis de hormonas que parecen tener un papel crucial en el cuajado del fruto.

### 2.1 Análisis transcriptómico del desarrollo del carpelo y cuajado del fruto en tomate

La caracterización del transcriptoma se realizó con el Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array, que permite determinar la expresión de más de 9000 genes. Se analizaron tres estadios de desarrollo del carpelo (botón floral, entre botón y pre-antesis, y antesis) y el momento del cuajado del fruto (3DPA) en dos líneas de tomate, la variedad UC82, que se empleó como variedad control y la línea RP75/59, que se caracteriza por su capacidad de producir frutos en ausencia de polinización y/o fecundación. Una vez caracterizado el transcriptoma, los datos se validaron mediante el análisis de la expresión de algunos genes con PCR cuantitativa a tiempo real. Se obtuvo una correlación muy buena entre ambos ensayos, a pesar de que el análisis transcriptómico mediante microarrays es una técnica semi-cuantitativa.

El análisis de las muestras en base a la expresión global de los genes reveló que éstas se agrupaban por estadios de desarrollo y no por línea, lo que indica que las diferencias entre ambas líneas son menores a las que existen entre estadios de desarrollo. En cuanto a los estadios de desarrollo, los dos estadios de botón floral se agruparon juntos y con el estadio de 3DPA, probablemente debido a que, a diferencia de lo que sucede en antesis, en estos tres estadios el carpelo está desarrollándose activamente..

Los genes modulados a lo largo de este proceso de desarrollo se identificaron con el programa maSigPro (Conesa *et al*, 2006). De esta manera, se consiguieron aislar 2842 genes,

## *Discusión*

cuya expresión se encuentra modulada a lo largo del desarrollo del carpelo, y 1358 genes, cuya expresión está regulada de diferente manera en las dos líneas empleadas. Sin embargo, de los 1358 genes que estaban modulados de manera diferente entre ambas líneas, únicamente 170 no pertenecían al grupo de 2842 genes modulados a lo largo del desarrollo del carpelo. Este hecho indica que entre ambas líneas no existen grandes diferencias en los genes implicados en el proceso, sino simplemente diferencias en la regulación de la expresión génica.

Al estudiar el patrón de expresión de los genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo los genes se agruparon en 15 grupos. Estos grupos muestran todos los patrones de expresión posibles, aunque la mayoría de grupos incluyen genes cuya expresión sufre cambios importantes alrededor del estadio de antesis. Esto era esperable puesto que al agrupar los estadios en función del transcriptoma el de antesis no se agrupó con los otros. Cuando comparamos los patrones de expresión génica en ambas líneas también se observó que las diferencias eran debidas más a cambios en el nivel de expresión que a cambios drásticos en el patrón de los genes. Además, las mayores diferencias se encontraron en el estadio de antesis probablemente debido a que en el caso de la línea partenocárpica en el estadio de antesis el carpelo no está esperando las señales de polinización y fecundación, sino simplemente en un paso transitorio entre carpelo y fruto.

### 2.2 Análisis transcriptómico del cuajado partenocárpico del fruto en tomate

Para determinar cuales son las diferencias de expresión génica que llevan al desarrollo partenocárpico del fruto se analizó el transcriptoma en la línea partenocárpica RP75/59 y la variedad control UC82 durante el cuajado. Puesto que la línea RP75/59 es capaz de producir tanto frutos partenocárpicos como frutos con semillas, fue necesario impedir la polinización y fecundación. Por lo que se trabajó con carpelos procedentes de flores que habían sido emasculadas dos días antes de que tuviera lugar la antesis. En el caso de la variedad control, estas flores se polinizaron a mano para asegurar el cuajado del fruto.

Cuando se agruparon las muestras procedentes de estos ensayos con las muestras de los ensayos anteriores, donde los carpelos procedían de flores que no habían sufrido ningún

tratamiento, se comprobó que el efecto de la emasculación era despreciable a 3DPA. Las muestras emasculadas y no emasculadas se agruparon en función del estadio de desarrollo y no en función de si habían sido o no emasculadas. En antesis las muestras se separaron primero por línea y luego en función de si habían sido o no emasculadas, lo que sugiere que en este estadio sí existía una pequeña influencia de la emasculación, debido bien al daño producido o a una posible polinización temprana en las flores no emasculadas.

Los genes regulados de diferente manera en la línea partenocárpica y en la variedad control durante el cuajado se identificaron con el programa maSigPro. De esta manera se consiguieron aislar 758 genes diferenciales, que en su gran mayoría también cambiaban durante el proceso de cuajado en la variedad control. Esto muestra que el transcriptoma no varía de manera drástica en función del tipo de fruto que se este desarrollando, más bien se trata de cambios en unos pocos genes que afectan a la regulación del proceso.

Al analizar los niveles de expresión de los genes aislados se obtuvieron 5 grupos. En general, al igual que ocurría al analizar los niveles de expresión en el carpelo, las diferencias entre ambas líneas eran debidas a diferencias en el nivel de expresión, más que a cambios drásticos en el patrón de expresión de los genes. Además, estas diferencias se concentraban en el estadio de antesis, como ocurría en las muestras no emasculadas, lo que indica que el desarrollo partenocárpico del fruto no difiere mucho del desarrollo normal y que las diferencias se dan en el carpelo en los momentos previos a que se produzca el cuajado.

### 2.3 Análisis funcional de los genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo y cuajado partenocárpico del fruto

Para realizar el análisis funcional de los genes aislados es necesario contar con una buena anotación de los genes representados en el microarray. Sin embargo, la anotación del microarray de tomate que proporcionaba Affymetrix únicamente cubría alrededor del 15% de los genes representados, lo que es insuficiente para poder realizar un análisis funcional a nivel global. Por ello se re-anotó el microarray con el programa Blast2GO (Conesa *et al*, 2005), consiguiéndose incrementar el porcentaje de genes anotados hasta el 60% y mejorando claramente la anotación

## Discusión

preexistente. La anotación esta basada casi en su totalidad en las anotaciones de los genes de *Arabidopsis*, ya que es la especie modelo en plantas y ha sido la más extensamente anotada. En cualquier caso la anotación es bastante precisa en las tres categorías (localización celular, función molecular y proceso biológico) puesto que la mayoría de los términos anotados están alrededor del nivel 6. Esta anotación es útil no sólo para analizar los resultados obtenidos en los experimentos realizados en esta tesis, sino para cualquier estudio futuro que se realice empleando Affymetrix GeneChip Tomato Genome Array.

Mediante el empleo de la nueva anotación del microarray fue posible realizar el análisis funcional a nivel global de los genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo en la variedad control. Entre los procesos representados por más de un 2% de los genes aislados se encontraban términos GO relacionados con: el metabolismo (lípidos, monosacáridos, aminoácidos, ARN y proteínas), el ciclo y división celular, y organización y replicación del ADN. Este enriquecimiento en genes relacionados con la regulación del ciclo celular se demostró estadísticamente cuando se analizaron los procesos biológicos que estaban sobre o sub-representados entre los genes regulados con respecto al resto de genes presentes en el microarray. Este hecho ya se había detectado al analizar los genes modulados en el cuajado del fruto en *Arabidopsis*, y era esperable puesto que el carpelo se divide activamente durante los estadios de botón floral y pre-antesis, tras los cuales se produce una parada en la división celular durante la antesis, hasta que tiene lugar la polinización y fecundación, que reactivan la división celular al inducir el cuajado del fruto (Gillaspy *et al*, 1993).

Al comparar los términos GO de los genes modulados de diferente manera a lo largo del desarrollo del carpelo en la línea partenocárpica, en condiciones donde ésta es capaz de producir frutos con semillas, con los de la variedad control, los términos GO presentes en más de un 2% fueron los mismos, puesto que la gran mayoría de genes también estaban regulados a lo largo del desarrollo normal. Esto indica que la capacidad de desarrollar frutos partenocárpicos no depende de grandes cambios en el transcriptoma ni de modificaciones en los procesos implicados en el desarrollo del carpelo.

Para detectar los procesos directamente implicados en el cuajado partenocárpico del fruto

se analizaron los términos GO de los genes identificados en el ensayo realizado con las muestras emasculadas. De nuevo, entre los términos representados por más de un 2% de los genes, volvemos a encontrar términos relacionados con metabolismo y un gran número de términos relacionados con organización del ADN, división celular y ciclo celular. El análisis estadístico, para detectar que procesos estaban sobre o sub-representados en los genes diferencialmente regulados en el cuajado partenocárpico, reveló también términos relacionados con organización del ADN y división celular, que estaban implicados en el desarrollo normal del carpelo.

#### 2.4 Regulación de los genes relacionados con el ciclo celular a lo largo del desarrollo del carpelo y cuajado partenocárpico del fruto

Durante los estadios de botón floral el carpelo se encuentra en un momento de división y diferenciación celular. Una vez se alcanza la madurez durante la antesis cesa la división celular y el carpelo permanece en un estado estático a la espera de las señales que inducirán el cuajado del fruto. Este proceso se caracteriza por un nuevo comienzo de la división y diferenciación celular, durante el cual, los tejidos que forman el carpelo se transforman para dar lugar al fruto (Gillaspy *et al*, 1993). Todos estos cambios relacionados con el ciclo celular se han detectado al analizar los procesos biológicos relacionados con el desarrollo del carpelo en la variedad control. De hecho, entre los genes relacionados con el ciclo celular regulados a lo largo del desarrollo del carpelo se detectaron dos patrones de expresión característicos. El primero, corresponde a genes que se encuentran activados durante los estadios de botón floral y cuajado del fruto momento en el que la división celular es más activa. El segundo, corresponde a genes que se encuentran activados durante la antesis y que están implicados en la parada en la división celular que tiene lugar durante este estadio.

Cuando nos fijamos en los genes diferencialmente expresados a lo largo del cuajado partenocárpico del fruto con respecto al cuajado normal, la mayoría de los genes pertenecen a genes inhibidos durante la antesis en la variedad control. En la línea partenocárpica la mayoría de estos genes no presentan una inhibición tan acusada durante la antesis. Por ejemplo, la ciclina D3:2, que ha sido previamente caracterizada en carpelos de tomate, se caracteriza por presentar una bajada en el nivel de expresión durante la antesis seguida por un aumento a 2DPA en

## Discusión

carpelos procedentes de flores polinizadas (Kvarnheden *et al*, 2000, Li *et al*, 2003), sin embargo, en la línea partenocárpica se encuentra activada durante la antesis. Esto indica que a diferencia de lo que ocurre en la variedad control en la línea partenocárpica el ciclo celular no se detiene durante la antesis, y el carpelo ya está desarrollándose para dar lugar a la formación del fruto.

La activación del ciclo celular durante la antesis ya ha sido sugerida en estudios realizados con otras variedades partenocárpicas de tomate. Hall y colaboradores (1986), comprobaron que al cultivar ovarios procedentes de flores recién abiertas *in vitro*, los ovarios de variedades partenocárpicas eran capaces de aumentar tanto su peso como diámetro mucho más que los ovarios de plantas no partenocárpicas. Mazucato y colaboradores (1998) detectaron que los ovarios del mutante *pat* presentaban un mayor tamaño durante la antesis, de hecho toda la maquinaria relacionada con el cuajado del fruto parece estar activada antes de la polinización. Fos y Nuez (1996) también describieron este hecho en plantas portadoras del gen *pat-2*, en las que el tamaño del ovario era significativamente mayor en la antesis.

A pesar de las diferencias detectadas durante la antesis no debemos olvidar que a 3DPA la línea partenocárpica RP75/59 parece seguir las mismas rutas metabólicas que la variedad control. La mayoría de los genes relacionados con ciclo celular, que se activan en la variedad control a 3DPA en respuesta a la polinización y fecundación, también se encuentran activados en la línea partenocárpica en este estadio, e incluso durante el estadio de antesis. Sin embargo, esto no es así cuando el desarrollo partenocárpico se induce de manera artificial. Por ejemplo con la aplicación de giberelinas, en este caso, la activación de los genes relacionados con el ciclo celular no es tan fuerte como si se polinizan las flores y no se activan ciertos genes como *KNOLLE* y la *CICLINA D3;3* (Vriezen *et al*, 2008).

### 2.5 Regulación de los genes relacionados con hormonas a lo largo del desarrollo del carpelo y cuajado partenocárpico del fruto

Las hormonas vegetales juegan un papel muy importante en la regulación de los procesos de desarrollo, incluidos el desarrollo del carpelo y del fruto. De hecho, desde hace más de 30 años se ha descrito la implicación de las cinco hormonas vegetales más importantes

(citoquininas, ácido abscísico, auxinas, etileno y giberelinas) en diversas fases del desarrollo del fruto (Nitsch 1970, Srivastava y Handa 2005). Por ello, a pesar de que al realizar el análisis funcional de los genes regulados a lo largo del desarrollo del carpelo y durante el cuajado partenocárpico del fruto no se detectaron términos relacionados con la función de las hormonas, se realizó un análisis gen a gen centrándonos en aquellos genes que se encontraban directamente relacionados con la regulación hormonal. Mediante este análisis se detectaron más de 100 genes relacionados con diferentes hormonas que estaban modulados a lo largo del desarrollo del carpelo. Estos genes constituyen una fuente de información muy útil para futuros estudios centrados en la regulación hormonal del desarrollo del carpelo.

Las hormonas vegetales también juegan un papel muy importante en el cuajado partenocárpico del fruto. Nitsch (1970) sugería que en el momento de la antesis el nivel de hormonas en el ovario es mínimo, tras la polinización y fecundación se produciría un aumento de señales reguladoras que inducirían el cuajado del fruto. Por ello, el cuajado del fruto puede ser inducido de manera artificial mediante la aplicación exógena de hormonas. Cuando se realizó un estudio en profundidad de todos los genes regulados diferencialmente en el cuajado partenocárpico del fruto se encontraron más de 20 genes relacionados con hormonas.

#### *Citoquininas y ácido abscísico (ABA)*

Las citoquininas se caracterizan por su implicación en la regulación del ciclo celular. Están implicadas en la fase de división celular que tiene lugar inmediatamente después del cuajado del fruto (Srivastava y Handa, 2005). Además, la aplicación exógena de citoquininas induce el cuajado partenocárpico (Malpelli, 1981). Durante el desarrollo del carpelo y cuajado normal del fruto se encuentran regulados ocho genes relacionados con esta hormona, siete de los cuales están activados durante la antesis. Sin embargo, en RP75/59 el desarrollo partenocárpico parece ser independiente de la acción de esta hormona, ya que entre los genes diferencialmente expresados en el cuajado de RP75/59 no se detectó ningún gen relacionado con las citoquininas diferencialmente expresado con respecto a la variedad control.

El ácido abscísico (ABA) está implicado en las respuestas de la planta a diversos tipos de

## Discusión

estreses y juega un papel importante en el desarrollo, maduración y inhibición de la germinación de las semillas. Durante el desarrollo del carpelo y cuajado normal del fruto se detectaron 12 genes relacionados con esta hormona, la mayoría de ellos también activados durante la antesis. Al analizar los genes diferencialmente expresados durante el cuajado partenocárpico del fruto se detectaron cuatro genes relacionados con el ABA. Estos genes se encontraban activados durante la antesis en la variedad control y presentaban una disminución del nivel de expresión a 3DPA, a diferencia de lo que ocurría en la línea partenocárpica, donde las diferencias de nivel de expresión entre los estadios eran mucho menores. Vriezen y colaboradores (2008) sugirieron que el ABA podría ser un regulador negativo del cuajado del fruto, puesto que detectaron una disminución del ABA al comienzo del cuajado del fruto. El ABA podría ser el encargado de inducir la parada del desarrollo que tiene lugar durante la antesis. En la línea partenocárpica la hormona no tendría ninguna función, puesto que durante la antesis no se produce la inhibición del ciclo celular y el carpelo no se encuentra en un estado estático sino que progresa para dar lugar al fruto.

## Giberelinas

Las giberelinas (GAs) controlan diversos procesos de desarrollo como: la germinación, elongación del tallo, floración y cuajado del fruto. El papel de las GAs en el cuajado partenocárpico del fruto es indiscutible. Se han descrito alteraciones en el contenido de esta hormona en las tres fuentes naturales de partenocarpia más importantes, *pat*, *Severianin* y *RP75/59*, además, la aplicación exógena de giberelinas en el carpelo induce el cuajado partenocárpico del fruto (Fos *et al* 2000, 2001 y Olimpieri *et al* 2007).

Al analizar los genes regulados durante el desarrollo del carpelo y cuajado normal del fruto se encontraron 20 genes relacionados con giberelinas, pero no se observó ningún patrón de expresión característico. Entre los genes regulados de manera diferente en el cuajado partenocárpico del fruto se detectaron cinco relacionados con giberelinas: la GA 2-oxidasa, una proteína tipo *GASA5*, el gen *DWARF3* y dos GA 20-oxidases, que juegan un papel muy importante en la síntesis de las GAs. Cuatro de estos genes también variaban en el desarrollo del carpelo y cuajado normal del fruto.

La ruta de síntesis de las giberelinas esta regulada en dos pasos, el que cataliza la GA 3 $\beta$ -hidrolasa y el que cataliza la GA 20-oxidasa (Hedden y Kamiya, 1997), por lo que estas enzimas controlan la cantidad de GAs activas. La expresión de las tres GA 20-oxidases que existen en tomate está regulada a lo largo del desarrollo de la flor. La GA 20-oxidasa 1, se expresa durante los estadios de botón floral, está inhibida durante la antesis y vuelve a expresarse durante el cuajado del fruto. La GA 20-oxidasa 2, está activada durante los estadios de botón floral y la GA 20-oxidasa 3, está activada únicamente durante el cuajado del fruto (Rebers *et al*, 1999). A pesar de que estos datos proceden de experimentos realizados en flor completa, de acuerdo con los resultados obtenidos, en la variedad control estos genes siguen un patrón de expresión muy similar en el carpelo. Sin embargo, al comparar la línea partenocárpica y no partenocárpica se detectó que las GA 20-oxidases 2 y 3 presentaban un mayor nivel de expresión durante la antesis en RP75/59. En concreto la GA 20-oxidasa 3 esta muy sobre-expresada en todos los estadios de desarrollo en la línea partenocárpica. Además, la enzima GA 2-oxidasa relacionada con la degradación de las GAs activas presenta un menor nivel de expresión en la línea partenocárpica.

Estos resultados sugieren que la partenocarpia en RP75/59 está mediada por la abundancia de GAs activas presentes en el ovario. Algo similar ocurre en el mutante *pat* donde la GA 20-oxidasa 1 se expresa de manera constitutiva (Olimpieri *et al* 2007). En RP75/59 sería la expresión de la GA 20-oxidasa 3 la que induciría el desarrollo partenocárpico del fruto. Sin embargo, cuando se induce el desarrollo partenocárpico del fruto mediante la aplicación exógena de GAs, los frutos que se producen suelen presentar escaso desarrollo de las cavidades locales (Ashira *et al* 1968, Serrani *et al* 2007), cosa que no ocurre en los frutos partenocárpicos producidos por la línea RP75/59, donde debe estar actuando otro factor además del exceso de GAs que permita el desarrollo de frutos sin malformaciones.

### Auxinas

Las auxinas están implicadas en un gran número de procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas. A nivel celular las auxinas promueven la división, extensión y diferenciación celular. Al igual que ocurre con las giberelinas se conoce su implicación en el cuajado del fruto desde hace más de 30 años (Crane, 1964). De hecho, una de las estrategias más comunes para

## Discusión

inducir el cuajado partenocárpico del fruto en diversas especies consiste en desarrollar plantas transgénicas portadoras de la construcción DefH9-iaaM, que induce la síntesis de auxinas en el ovario (Rotino *et al.*, 1997). Además, a diferencia de lo que ocurre con las giberelinas la aplicación de auxinas de manera exógena induce el desarrollo de frutos partenocárpicos que presentan desarrollo normal de los lóculos (Serrani *et al.*, 2007).

Entre los genes relacionados con el desarrollo del carpelo y cuajado normal del fruto se detectaron 40 relacionados con auxinas, estos genes no presentaban ningún patrón de expresión característico. Cuando analizamos los genes diferencialmente expresados en el cuajado partenocárpico del fruto se detectaron 12 genes, 10 de los cuales también variaban a lo largo del desarrollo del carpelo y cuajado normal del fruto. Entre estos genes no se detectó ningún gen relacionado con la síntesis de esta hormona, sólo se detectaron proteínas relacionadas con el transporte y de respuesta. El metabolismo de las auxinas no parece estar alterado en la línea RP75/59 con respecto a la variedad control, sin embargo, las auxinas se producen en repuesta a la polinización y en las semillas en desarrollo (revisado por Ozga y Reinecke, 2003), estímulos que no existen en la línea partenocárpica pero si en la variedad control. Podría ser que en la línea partenocárpica RP75/59, que es capaz de producir frutos con estructuras pseudoembrionarias, las auxinas se produzcan en estas estructuras, como ocurre en la variedad *Severianin*, donde las estructuras pseudoembrionarias sustituyen a las semillas en los frutos partenocárpicos (Lin *et al.*, 1983a y Kataoka *et al.*, 2003).

Sin embargo, lo que si se detectaron fueron varios genes relacionados con la respuesta a auxinas que podrían tener un papel importante en la inducción del desarrollo partenocárpico. De hecho se ha descrito que el silenciamiento de los genes IAA9 en tomate y IAA8 en *Arabidopsis* es suficiente para inducir el desarrollo del fruto en ausencia de polinización y fecundación (Wang *et al.*, 2005; Goetz *et al.*, 2007). En la línea partenocárpica el gen IAA10 se encuentra sobre-expresado a 3DPA, y un gen tipo GH3 también se encuentra activado en anthesis y a 3DPA. Por otro lado, el gen IAA2 y el gen AXR2/IAA7 que se encuentran activados a 3DPA con respecto anthesis en ambas líneas cuando se permite la polinización, no muestran una activación tan grande en los carpelos procedentes de flores emasculadas y no polinizadas. Probablemente ambos genes se activen únicamente en respuesta a la polinización. Vriezen y colaboradores (2008) ya

detectaron que el gen IAA2 no se activaba tras un tratamiento con GA3 para inducir el cuajado partenocárpico del fruto. La variabilidad de comportamientos en los genes de respuesta a auxinas muestra la complejidad de los efectos producidos por esta hormona, y el hecho de que el desarrollo partenocárpico del fruto a pesar de tener muchas cosas en común con el desarrollo del fruto con semillas, no sigue exactamente las mismas vías que este.

### *Etileno*

El etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) es la hormona vegetal más estudiada, juega un papel importantísimo en el proceso de senescencia de diversos órganos de la planta y en la maduración de los frutos climatéricos (Alba *et al*, 2005; Giovannoni, 2004; Srivastava y Handa, 2005). También está implicado en el desarrollo del ovario y en la respuesta a la polinización en orquídeas (Zang y O'Neill, 1993; O'Neill, 1997). En tomate tras la polinización se produce un aumento en la producción de etileno que acelera la senescencia de los pétalos (a las 72h, cuando se produce el cuajado, la producción de esta hormona disminuye (Llop-Tous *et al* 2000)).

Cuando se analizó el comportamiento de los genes relacionados con etileno se detectaron 38 genes regulados en el desarrollo del carpelo y cuajado normal del fruto. La mayoría de estos genes se encontraban inhibidos a 3DPA en la línea partenocárpica y en la control. Este descenso en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis y señalización de etileno también ha sido descrito por Vriezen y colaboradores (2008) en ovarios de tomate tras la polinización o el tratamiento con GAs para inducir el cuajado.

Al analizar las diferencias entre el cuajado normal y partenocárpico se detectaron cinco genes relacionados con el etileno, todos ellos regulados durante el desarrollo del carpelo y cuajado normal del fruto. Entre los genes aislados destaca la ACO5 (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidasa 5) que es el último enzima de la ruta de síntesis del etileno y un punto clave para la regulación de la producción de la hormona (Kende, 1993). La expresión de este gen está claramente activada en el carpelo en la línea partenocárpica durante la antesis con respecto a lo que ocurre en el carpelo de la variedad control. Además, el nivel de expresión en la línea partenocárpica es mayor al de la variedad control en todos los estadios analizados.

Tanto el patrón de expresión de los genes relacionados con el etileno como las diferencias observadas entre la línea partenocárpica y la variedad control, sugieren que el etileno juega un papel muy importante en el desarrollo del carpelo y el cuajado del fruto. En orquídeas la maduración del ovulo y del ovario están mediados por el etileno y las auxinas que se producen en respuesta a la polinización (O'Neill, 1997). Esta relación entre las auxinas y el etileno ha sido también recientemente descrita en tomate. En esta especie, el mutante *dgt* presenta alteraciones en la expresión génica de un subgrupo de genes relacionados con la respuesta a auxinas (IAAs) y la síntesis de etileno (ACS), que dan como resultado alteraciones en la morfología del fruto (Balbi y Lomax 2003). Los estudios transcriptómicos realizados con plantas donde el gen *IAA9* se encuentra silenciado indican que estas plantas presentan alteraciones en genes relacionados con el etileno (Wang *et al*, 2009). Además, plantas transgénicas que tienen sobre-expresado el gen *SITRPI*, relacionado con los receptores de etileno, también presentan alteraciones en la expresión del gen *IAA9*, relacionado con la respuesta a auxinas (Lin *et al*, 2008). En la línea RP75/59 las alteraciones en la síntesis del etileno mimetizarían las señales producidas por la polinización e inducirían la síntesis de auxinas en el carpelo, que junto con el exceso de GAs activas presentes serían responsables de la inducción del desarrollo del carpelo.

### **3. Construcción y caracterización de una población F2 para la localización de los genes responsables de la partenocarpia de RP75/59**

La línea RP75/59 desarrollada a partir de un cruce entre “Atom” x “Bubjekosoko” es capaz de producir frutos sin semillas de las mismas características morfológicas que los frutos normales. A partir de los análisis transcriptómicos realizados en esta línea y en variedades control se han podido descubrir ciertos genes como la GA20-oxidasa 3 y la ACO5 que juegan un papel muy importante en la regulación del cuajado en esta línea. Sin embargo, se desconoce cuales son los genes responsables de este fenotipo y en que zona del genoma se encuentran. El aislamiento de los genes directamente responsables de este fenotipo sería muy interesante tanto desde el punto de vista científico como aplicado, ya que permitiría introducir este carácter en variedades de tomate que presentan problemas de cuajado de manera mucho más rápida. Hasta la fecha no se han conseguido realizar avances significativos en este sentido, probablemente debido a las dificultades a la hora de caracterizar este fenotipo. En esta tesis se planteó desarrollar y

caracterizar una población F2 que permita realizar la localización de los genes responsables de la partenocarpia de la línea RP75/59, tanto mediante cartografiado genético como mediante una estrategia de genes candidatos.

### 3.1 Caracterización de una población segregante para la partenocarpia

Durante el desarrollo de la tesis primero se desarrolló una población F2 a partir del cruce entre la variedad no partenocárpica UC82, que es incapaz de producir frutos sin semillas de características similares a los de los frutos normales, y la línea RP75/59. Una vez obtenida la población F2 se realizó la caracterización en condiciones de invernadero, que permitieron minimizar las variaciones ambientales. Para evitar los problemas de competencia entre los frutos con y sin semillas las plantas se cultivaron en dos guías. La primera guía se empleó para determinar la capacidad de cuajado tras polinización, y la segunda para determinar la capacidad de cuajado partenocárpico. Se caracterizaron cuatro ramilletes de flores y tres flores por ramillete en cada guía, para minimizar la competencia. La capacidad de cuajado partenocárpico se determinó emasculando las flores antes de la antesis. Se caracterizaron todos los frutos producidos, independientemente del tamaño y las características morfológicas. Se tomaron caracteres de peso forma y desarrollo de los lóculos.

Primero se realizó una clasificación de los frutos producidos en función de sus características morfológicas. Se distinguieron 5 tipos, frutos con semillas, frutos con pseudoembriones, frutos jugosos, frutos macizos y frutos vacíos. Entre estas clases destacaban los frutos con pseudoembriones que presentaban desarrollo normal de los lóculos y un peso medio muy similar al de los frutos con semillas, a diferencia de los frutos jugosos que presentaban desarrollo locular normal, pero un peso menor. Las plantas se agruparon mediante un análisis PCA, en función del porcentaje de frutos de cada tipo producidos y el peso medio de los frutos. Este análisis mostró que los parentales se encontraban situados en posiciones extremas y que las plantas de la F2 formaban un continuo entre ambos parentales, lo que dificultaba la asignación de clases discretas. Para poder separar las plantas en clases discretas se agruparon en función del tipo de frutos que eran capaces de producir en cinco clases excluyentes. Al representar en el PCA las plantas de cada clase se observó, que las plantas pertenecientes a la

## *Discusión*

clase 1, capaces de producir frutos con pseudoembriones, se encontraban más cercanas al parental partenocárpico que ninguna de las otras clases.

Con objeto de determinar si la producción de cierto tipo de frutos estaba condicionada por la expresión génica, se analizó la expresión de algunos de los genes expresados diferencialmente en el cuajado partenocárpico del fruto en varias plantas de cada una de las clases. Al analizar la expresión génica mediante PCA se observó también un continuo, donde de nuevo, los parentales se situaban en los extremos y las plantas de la F2 entre ellos. Aunque las plantas de la clase 1, al igual que ocurría en el análisis anterior, se situaron más cerca del parental partenocárpico.

Al observar los PCAs obtenidos a partir de la caracterización de los frutos y del análisis de la expresión génica queda patente que la F2 se comporta como un continuo donde en realidad no existen clases claramente diferenciadas. De hecho, las plantas ya presentan una variación continua en el número de frutos cuajados y en el porcentaje de cada tipo de fruto. Además, al analizar los frutos producidos, ya se obtienen distintas clases que representan un continuo entre los frutos vacíos con malformaciones severas, hasta llegar a los frutos con pseudoembriones, que no presentan malformaciones y además tienen un tamaño comparable a los frutos con semillas. La partenocarpia en realidad sería un carácter cuantitativo y continuo.

### 3.2 Ajuste de la segregación a los modelos anteriormente propuestos

A pesar de que existen diversos estudios previos en poblaciones segregantes para la partenocarpia procedente de la línea RP75/59, en cada estudio se han empleado diversos criterios para clasificar las plantas, lo que ha llevado a la formulación de distintos modelos para explicar la genética de este carácter. Vardy y colaboradores (1989a), clasificaron las plantas en función del porcentaje de frutos sin semillas producidos en las tres primeras inflorescencias en condiciones que impiden la polinización, eso si, descartando los frutos de pequeño tamaño y que presentaban desarrollo anormal de los lóculos. Los autores consideraron que existían tres clases de plantas, las que no produjeron frutos: las que produjeron menos del 55% de frutos y las que produjeron el 55% o más frutos. Sin embargo, este sistema presentaba un grave defecto de base,

estaba obviando los problemas de competencia. Los autores calcularon el porcentaje de frutos en función de la cantidad de flores que hay en los tres primeros ramilletes, pero no se da ningún dato de la cantidad de flores total, ni de si en todas las plantas analizadas los ramilletes contenían el mismo número de flores, con lo que los datos pueden estar completamente sesgados. No es equivalente que una planta con 20 flores totales de un 60% de frutos que otra planta con 40 flores de el mismo porcentaje. De hecho, en muchos casos cuando se ha producido el cuajado de casi todas las flores del ramillete las últimas pueden llegar a caer antes de que se produzca la antesis.

El grupo de Nuez y colaboradores (1986) no empleó este criterio, sino que consideraron partenocárpica cualquier planta capaz de producir frutos sin semillas de características similares a los frutos con semillas. Sin embargo, se enfrentaron a un problema debido a las diferencias de tamaño de los frutos analizados. La línea RP75/59 produce frutos de pequeño tamaño, con lo que al desarrollar las poblaciones segregantes a partir del cruce con otras variedades, que producen frutos de mayor tamaño, se hace muy difícil determinar en que punto los frutos sin semillas son o no del tamaño adecuado (Cuartero *et al*, 1987). Trataron de solucionar este problema empleando variedades no partenocárpicas de fruto pequeño (Nuez *et al* 1988). Al emplear estas aproximaciones, los autores se encontraron con una distribución continua, probablemente debido a que, tanto el tamaño del fruto, como la producción de frutos partenocárpico están condicionados por las condiciones ambientales. Es por tanto necesario establecer un criterio claro para la clasificación de las plantas, que permita evitar la pérdida de información y en la medida de lo posible las variaciones debidas a, diferencias ambientales, y a la competencia existente entre frutos.

En esta tesis queda patente que en realidad la partenocarpia es un carácter continuo, aunque, para poder comparar con los trabajos anteriores, se decidió considerar “partenocárpicas” las plantas con capacidad para producir frutos con características parecidas a los frutos con semillas, independientemente del porcentaje de frutos producidos, y de su capacidad para producir otros tipos de frutos. Únicamente se consideraron partenocárpicas las plantas pertenecientes a la clase 1, capaces de producir frutos con pseudoembriones. Siguiendo este criterio se comprobó el ajuste de la segregación observada en la F2 a los modelos propuestos por

## Discusión

Vardy y Nuez. El modelo de Vardy y colaboradores (1989a) basado en la existencia de tres genes recesivos con efecto aditivo no se ajustó a los datos obtenidos en la F2. El modelo propuesto por Nuez y colaboradores (1986, 1988) basado en la existencia de los genes parcialmente recesivos sí se ajusta a los datos observados en la F2.

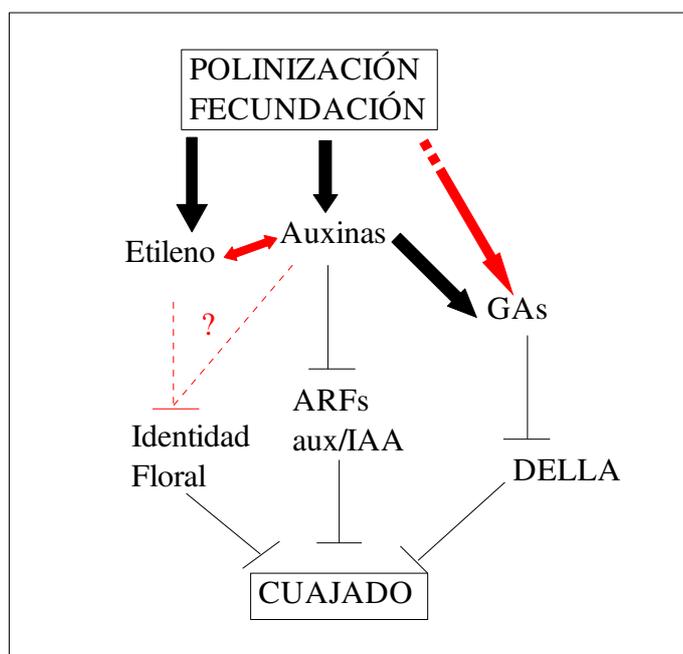
Sin embargo, ninguno de los dos modelos explica el hecho de que la F1 fuera capaz de producir un fruto con pseudoembriones. Esto se debería a que en las condiciones ensayadas donde no existe competencia entre frutos (únicamente existen flores emasculadas) en determinadas condiciones ambientales incluso las plantas heterocigotas serían capaces de producir algún fruto con pseudoembriones. En este sentido se debe tener en cuenta que según el análisis transcriptómico la partenocarpia en la línea RP75/59 estaría mediada por alteraciones en el balance hormonal en el carpelo, y este balance está afectado por las condiciones ambientales y fisiológicas de la planta. Por ello, aunque la segregación de la población F2 se ajusta más al modelo de dos genes para tratar de localizar los genes responsables de este fenotipo lo más adecuado es tratar el carácter como continuo y emplear una estrategia para la localización de QTLs, sin olvidar que ya se disponen de datos de expresión génica en los parentales que permiten emplear también una aproximación de genes candidatos.

## 4. Regulación del cuajado del fruto

Como se deduce de los estudios realizados en tomate y *Arabidopsis* el cuajado viene determinado por el control del ciclo celular, proceso que está estrechamente controlado a lo largo del desarrollo del carpelo y fruto. Durante el desarrollo floral, el carpelo se divide activamente hasta llegar a la antesis, en ese momento se produce una parada en el desarrollo, que coincide con una bajada de la concentración hormonal en el ovario. Posteriormente, la polinización y fecundación alteran los contenidos hormonales del carpelo induciendo el cuajado y la reanudación del desarrollo del carpelo (Gillaspy *et al*, 1993). A diferencia de lo que ocurre de manera habitual en la línea RP75/59 no existe esta inhibición del ciclo celular en antesis y el carpelo continúa desarrollándose sin necesidad de ningún estímulo.

A partir de los análisis realizados tanto en la especie modelo *Arabidopsis*, como en

tomate durante el desarrollo normal y partenocárpico del carpelo, ha sido posible desarrollar un modelo de acción hormonal para explicar el desarrollo del carpelo (Figura 35). Durante la antesis en tomate estarían actuando conjuntamente al menos tres mecanismos que inhibirían el desarrollo. Por un lado genes ARFs y aux/IAA estarían bloqueando el desarrollo del fruto, puesto que al inhibir la expresión de genes de este tipo se produce desarrollo del fruto en ausencia de fecundación y polinización (Wang *et al*, 2005; Goetz *et al*, 2007; de Jong *et al*, 2009b). Por otro lado, las proteínas DELLA también estarían inhibiendo el cuajado mediante la regulación negativa de la expresión de los genes de respuesta a GAs (Marti *et al*, 2007). Además, también estarían actuando genes responsables de la diferenciación de los diversos verticilos de la flor, como TM5 y TM29 (Pnueli *et al*, 1994b y Ampoach-Dwamena *et al*, 2002).



**Figura 35.** Mecanismos que bloquean el cuajado durante la antesis.

Tal y como se observa en la figura 35 tras la polinización y fecundación se produciría una cascada de señales hormonales que inactivaría los mecanismos que bloquean el cuajado. Por un lado la polinización induciría la producción de etileno, esta hormona ,además de inducir la senescencia de los pétalos (Llop-tous *et al*, 1999), estaría implicada en la regulación del cuajado mediante la inhibición de los genes responsables de la identidad floral, de manera análoga a lo que ocurre en orquídeas, donde el etileno es el responsable de la maduración final del carpelo

## Discusión

(Zang y O'Neill, 1993). Esta actividad podría estar acompañada de la inducción de la producción de auxinas y la regulación junto con estas de los genes ARFs y aux/IAA, de manera similar a lo que ocurre durante el desarrollo de la raíz en *Arabidopsis*, en esta especie el etileno induce la síntesis de auxinas en la raíz, lo que aumenta su capacidad para inhibir la expansión celular en la raíz (Swarup *et al*, 2007). Esta relación del etileno con el cuajado del fruto ha sido muy recientemente descrita en tomate. Wan y colaboradores (2009) analizaron el transcriptoma durante el cuajado del fruto en plantas transgénicas donde la expresión del gen *IAA9* estaba inhibida y detectaron alteraciones en genes relacionados con el etileno. Lin y colaboradores (2008) al analizar plantas transgénicas donde el gen *SITRP*, relacionado con los receptores de etileno, estaba sobre-expresado detectaron alteraciones en la expresión de los genes *IAA9* y *SAURI*, relacionados con la respuesta a auxinas. Además del etileno, la polinización también induce directamente o vía la acción de otras hormonas la producción de auxinas y GAs que inhibirían los ARFs, aux/IAA y DELLA, posibilitando que tenga lugar el cuajado del fruto.

En cualquier caso, de los estudios realizados con plantas que tienen inactivado alguno de los mecanismos que bloquean el cuajado se deduce que, estos mecanismos no son independientes. De hecho, la inactivación de alguno de los genes implicados parece ser suficiente para inducir el desarrollo del carpelo. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos cuando se inhibe únicamente uno de los mecanismos que bloquea el cuajado los frutos que se desarrollan presentan malformaciones, lo que indica que las señales hormonales producidas por las semillas son necesarias para el correcto desarrollo del fruto.

En la línea partenocárpica RP75/59 la sobre-expresión de la GA20 oxidasa 3 y de la ACO5 actuarían como sustitutas de la señal de polinización y desactivarían los mecanismos de inhibición del cuajado e inducirían la síntesis de auxinas. Posteriormente, la formación de pseudoembriones que actuarían como fuente de hormonas en sustitución de las semillas, posibilitaría el desarrollo de frutos con desarrollo locular y tamaño normal.

## **VI. CONCLUSIONES**



1. Mediante una sustracción de genotecas de flores de la variedad UC82 de tomate en el estadio 3DPA respecto al de antesis, se ha desarrollado una librería enriquecida en genes potencialmente relacionados con el cuajado del fruto. Se ha comprobado que incluso entre los genes representados por un único clon hay genes diferenciales, lo que muestra la escasa redundancia de esta genoteca, que es una excelente fuente para la búsqueda de genes implicados en el cuajado de tomate.
2. A partir de los resultados de las hibridaciones de microarrays depositados en la base de datos del proyecto AtGenExpress, se han conseguido identificar 1879 genes regulados durante el desarrollo del carpelo y el desarrollo temprano de la silicua en *Arabidopsis*.
3. Hemos comprobado que un 78% de los genes regulados en *Arabidopsis* también están regulados en tomate, lo que indica que los genes implicados en el cuajado del fruto son los mismos en ambas especies, a pesar de las diferencias entre sus frutos.
4. A pesar de la alta conservación encontrada entre los genes implicados en el cuajado de ambas especies no hemos encontrado correlación entre los patrones de expresión. Esta falta de correlación podría ser debida a la dificultad en determinar la equivalencia entre estadios y al hecho de que estamos estudiando un proceso complejo en el que participan tejidos muy diversos.
5. El análisis transcriptómico del desarrollo del carpelo en tomate ha permitido identificar 2842 genes regulados a lo largo del tiempo. En el análisis funcional se han identificado un gran número de genes relacionados con el ciclo celular y con la respuesta y metabolismo de hormonas.
6. La comparación entre los distintos estadios de desarrollo muestra que la antesis es el estadio clave donde se producen cambios en el patrón de expresión en la mayoría de los genes. Los estadios de botón floral, pre-antesis y 3DPA se agruparon juntos, probablemente debido a que, a diferencia de lo que sucede en antesis, en estos tres estadios el carpelo está desarrollándose activamente.

## *Conclusiones*

7. El análisis global de las hibridaciones realizadas reveló que se agrupaban por estadios de desarrollo y no por línea, lo que indica que las diferencias entre la línea partenocárpica y no partenocárpica son menores a las que existen entre estadios de desarrollo.

8. Se han identificado 758 genes diferencialmente regulados en el cuajado partenocárpico del fruto de RP75/59. Las diferencias de expresión están centradas en el estadio de antesis. Esto indica que el desarrollo partenocárpico del carpelo no difiere mucho del desarrollo normal y que las diferencias se dan en los momentos previos a que se produzca el cuajado.

9. El análisis de la expresión de los genes relacionados con el ciclo celular muestra que en la línea partenocárpica no existe una parada en la división celular durante la antesis, a diferencia de lo que ocurre en la variedad control, donde el carpelo cesa su desarrollo hasta que tiene lugar la polinización y fecundación. Indicando que en la línea RP75/59 la antesis no es más que un estadio transitorio entre carpelo y fruto.

10. En la línea partenocárpica RP75/59 la alta concentración de GAs en el carpelo se debe a la sobre-expresión de la GA20-oxidasa 3 en todos los estadios analizados. La concentración de GAs posibilita el desarrollo del fruto en ausencia de polinización y fecundación.

11. En la línea RP75/59 la sobre-expresión del gen ACO5 a lo largo de todos los estadios estudiados alteraría la síntesis de etileno lo que podría inducir la síntesis de auxinas y el cuajado del fruto.

12. La caracterización de los frutos y del análisis de la expresión de la F2 y de los parentales UC82 y RP75/59 no permite diferenciar clases fenotípicas entre las plantas. La partenocarpia de esta línea es un carácter cuantitativo y continuo.

13. Considerando partenocárpicas únicamente las plantas capaces de producir frutos con pseudoembriones, lo que equivale a frutos con características similares a los frutos con semillas, hemos comprobado que los datos de la segregación se ajustan al modelo de herencia propuesto por Nuez y colaboradores basado en la acción de dos genes parcialmente recesivos.

14. A partir de los análisis realizados, tanto en tomate durante el desarrollo normal y partenocárpico del carpelo, como en la especie modelo *Arabidopsis*, ha sido posible desarrollar un modelo de acción hormonal para explicar la reanudación del desarrollo durante la antesis.

15. Según este modelo en la línea partenocárpica RP75/59 la sobre-expresión de la GA20 oxidasa 3 y de la ACO5 actuarían como sustitutas de la señal de polinización y desactivarían algún mecanismo de inhibición del cuajado. Durante el desarrollo del fruto los pseudoembriones sintetizarían las hormonas que posibilitarían la formación de frutos con un desarrollo locular normal.



## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Dopazo J. 2004. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 20, 578-580.

Al-Shahrour F, Minguéz P, Tarraga J, Montaner D, Alloza E, Vaquerizas JM, Conde L, Blaschke C, Vera J, Dopazo J. 2006. BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Research* 34, W472-W476.

Alabadi D, Agüero MS, Pérez-Amador MA, Carbonell J. 1996. Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase and polyamines in tomato ovaries - Changes in unpollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin or gibberellin. *Plant Physiology* 112, 1237-1244.

Alba R, Payton P, Fei ZJ, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ. 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* 17, 2954-2965.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.

Ampomah-Dwamena C, Morris BA, Sutherland P, Veit B, Yao JL. 2002. Down-regulation of TM29, a tomato SEPALLATA homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiology* 130, 605-617.

Asahira T, Takagi H, Takeda Y, Tsukamoto Y. 1968. Cytokinin activity in extracts from pollinated, auxin- and gibberellin-induced parthenocarpic tomato fruits and its effect on the histology of the fruit. En: *Studies on fruit development on tomato II*. Mem Res Inst Food Sci Kyoto University 29:24-54

## Bibliografía

- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25, 25-29.
- Balbi V, Lomax TL. 2003. Regulation of early tomato fruit development by the *diageotropica* gene. *Plant Physiology* 131, 186-197.
- Beraldi D, Picarella ME, Soressi GP, Mazzucato A. 2004. Fine mapping of the parthenocarpic fruit (*pat*) mutation in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 108, 209-216.
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C. 2004. Multiple pathways in the decision to flower: Enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* 16, S18-S31.
- Brukhin V, Hernould M, Gonzalez N, Chevalier C, Mouras A. 2003. Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. *sweet cherry*. *Sexual Plant Reproduction* 15, 311-320.
- Bouxin, G. 2005. Ginkgo, a multivariate analysis package. *Journal of Vegetation Science* 16, 353-359.
- Bugos RC, Chiang VL, Zhang XH, Campbell ER, Podila GK, Campbell WH. 1995. RNA isolation from plant-tissues recalcitrant to extraction in guanidine. *Biotechniques* 19, 734-737.
- Buzgo M, Soltis DE, Soltis PS, Ma H. 2004. Towards a comprehensive integration of morphological and genetic studies of floral development. *Trends in Plant Science* 9, 164-173.
- Carmi N, Salts Y, Dedicova B, Shabtai S, Barg R. 2003. Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary. *Planta* 217, 726-735.

Calvert A. 1957. Effect of the early environment on the development of flowering in the tomato. I. Temperature. *Journal of Horticultural Science* 32, 9–17.

Chamarro J. 1995. Anatomía y fisiología de la planta. En: Nuez F. (ed.) *El cultivo del tomate*. Mundi-Prensa, Madrid, 43-92.

Chareonboonsit S, Splittstoesser WE, George WL. 1985. The effects of pollination methods and auxin applications upon parthenocarpic fruit-set and development in tomato. *Scientia Horticulturae* 27, 1-8.

Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674-3676.

Conesa A, Nueda MJ, Ferrer A, Talon M. 2006. maSigPro: a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments. *Bioinformatics* 22, 1096-1102.

Costantini E, Landi L, Silvestroni O, Pandolfini T, Spena A, Mezzetti B. 2007. Auxin synthesis-encoding transgene enhances grape fecundity. *Plant Physiology* 143, 1689-1694.

Crane JC. 1964. Growth substances in fruit setting and development. *Annual Review of Plant Physiology* 15, 303-&.

Cuartero J, Costa J, Nuez F. 1987. Problems of determining parthenocarpy in tomato plants. *Scientia Horticulturae* 32, 9-15.

de Folter S, Busscher J, Colombo L, Losa A, Angenent GC. 2004. Transcript profiling of transcription factor genes during silique development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 56, 351-366.

de Jong M, Mariani C, Vriezen WH. 2009a. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *Journal of experimental Botany* 60, 1523-1532.

de Jong M, Wolters-Arts M, Feron R, Mariani C, Vriezen WH. 2009b. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SlARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *Plant Journal* 57, 160-170.

Farineau J, Lavalmartin D. 1977. Light versus dark carbon metabolism in cherry tomato fruits .2. relationship between malate metabolism and photosynthetic activity. *Plant Physiology* 60, 877-880.

Faurobert M, Mihr C, Bertin N, Pawlowski T, Negroni L, Sommerer N, Causse M. 2007. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiology* 143, 1327-1346.

Fei ZJ, Tang XM, Alba R, Giovannoni J. 2006. Tomato Expression Database (TED): a suite of data presentation and analysis tools. *Nucleic Acids Research* 34, D766-D770.

Fei ZJ, Tang X, Alba RM, White JA, Ronning CM, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ. 2004. Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. *Plant Journal* 40, 47-59.

Ferrario S, Immink RG, Angenent GC. 2004. Conservation and diversity in flower land. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 84-91.

Ficcadenti N, Sestili S, Pandolfini T, Cirillo C, Rotino GL, Spena A. 1999. Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Molecular Breeding* 5, 463-470.

Finkers R, van Heusden AW, Meijer-Dekens F, van Kan JAL, Maris P, Lindhout P. 2007. The construction of a *Solanum habrochaites* LYC4 introgression line population and the identification of QTLs for resistance to *Botrytis cinerea*. *Theoretical and Applied Genetics* 114, 1071-1080.

Fos M, Nuez F. 1996. Molecular expression of genes involved in parthenocarpic fruit set in tomato. *Physiologia Plantarum* 98, 165-171.

Fos M, Nuez F, Garcia-Martinez JL. 2000. The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiology* 122, 471-479.

Fos M, Proano K, Alabadi D, Nuez F, Carbonell J, Garcia-Martinez JL. 2003. Polyamine metabolism is altered in unpollinated parthenocarpic *pat-2* tomato ovaries. *Plant Physiology* 131, 359-366.

Fos M, Proano K, Nuez F, Garcia-Martinez JL. 2001. Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiologia Plantarum* 111, 545-550.

Gillaspy G, Bendavid H, Gruissem W. 1993. Fruits - a developmental perspective. *Plant Cell* 5, 1439-1451.

Giovannoni JJ. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16, S170-S180.

Goetz M, Hooper LC, Johnson SD, Rodrigues JCM, Vivian-Smith A, Koltunow AM. 2007. Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiology* 145, 351-366.

## *Bibliografía*

- Gorguet B, Eggink PM, Ocana J, Tiwari A, Schipper D, Finkers R, Visser RGF, van Heusden AW. 2008. Mapping and characterization of novel parthenocarp QTLs in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 116, 755-767.
- Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P. 2005. Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biology* 7, 131-139.
- Gu Q, Ferrandiz C, Yanofsky MF, Martienssen R. 1998. The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* 125, 1509-1517.
- Gustafson FG. 1936. Inducement of fruit development by growth-promoting chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 22, 628-636.
- Hagen G, Guilfoyle TJ, Gray WM. 2004. Auxin signal transduction. En: Davies PJ. (ed.), *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 282-303.
- Hall CB, Scott JW, George WL. 1986. Growth of ovaries of parthenocarpic and nonparthenocarpic tomato genotypes invitro. *Hortscience* 21, 289-291.
- Hartigan JA, Wong MA. 1978. A K-means clustering algoritjm. *Applied Statistics* 28, 100-108.
- Hedden P, Kamiya Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: Enzymes, genes and their regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 431-460.
- Hedden P, Phillips AL. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* 5, 523-530.
- Hennig L, Gruissem W, Grossniklaus U, Kohler C. 2004. Transcriptional programs of early reproductive stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135, 1765-1775.

Herrero J, Valencia A, Dopazo J. 2001. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* 17, 126-136.

Heuvelink E. 2005. Developmental processes. En: Heuvelink E. (ed.), *Tomatoes*. CAB International, Wallingford, 53-83.

Imanishi S, Nagata M. 2004. The effect of methyl jasmonate on the expression of ripening related genes in tomato fruits. 45th Annual Meeting of the Japanese-Society-for-Plant-Physiologists, Vol. 45. Hachioji, JAPAN, S78-S78.

Immink RGH, Hannapel DJ, Ferrario S, Busscher M, Franken J, Campagne MML, Angenent GC. 1999. A petunia MADS box gene involved in the transition from vegetative to reproductive development. *Development* 126, 5117-5126.

Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. 2003. Summaries of affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Research* 31.

Kataoka K, Uemachi A, Yazawa S. 2003. Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in *pat-2* and auxin-induced parthenocarpic tomato fruits. *Scientia Horticulturae* 98, 9-16.

Karapanos IC, Mahmood S, Thanopoulos C. 2008. Fruit set in *Solanaceous* vegetable crops as affected by floral and environmental factors. *The European Journal of plant Science and Biotechnology* 2 (special issue 1), 88-105.

Kende H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 283-307.

Klee HJ, Clark DG. 2004. Ethylene signal transduction in fruits and flowers. En: Davies PJ. (ed.), *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 369-390.

Krizek BA, Fletcher JC. 2005. Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide. *Nature Reviews Genetics* 6, 688-698.

Kvarnheden A, Yao JL, Zhan XC, O'Brien I, Morris BAM. 2000. Isolation of three distinct CycD3 genes expressed during fruit development in tomato. *Journal of Experimental Botany* 51, 1789-1797.

Lemaire-Chamley M, Petit J, Garcia V, Just D, Baldet P, Germain V, Fagard M, Mouassite M, Cheniclet C, Rothan C. 2005. Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiology* 139, 750-769.

Li Y, Yu JQ, Ye QJ, Zhu ZJ, Guo ZJ. 2003. Expression of CycD3 is transiently increased by pollination and N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea in ovaries of *Lagenaria leucantha*. *Journal of Experimental Botany* 54, 1245-1251.

Lin S, George WL, Splittstoesser WE. 1984. Expression and inheritance of parthenocarpy in *Severianin* tomato. *Journal of Heredity* 75, 62-66.

Lin S, Splittstoesser WE, George WL. 1983a. A comparison of normal seeds and pseudoembryos produced in parthenocarpic fruit of *severianin* tomato. *Hortscience* 18, 75-76.

Lin S, Splittstoesser WE, George WL. 1983b. Factors controlling the expression of parthenocarpy in *severianin* tomato. *Scientia Horticulturae* 19, 45-53.

Lin ZF, Arciga-Reyes L, Zhong SL, Alexander L, Hackett R, Wilson I, Grierson D. 2008. SITPR1, a tomato tetratricopeptide repeat protein, interacts with the ethylene receptors NR and LeETR1, modulating ethylene and auxin responses and development. *Journal of Experimental Botany* 59, 4271-4287.

Liu WH, Saint DA. 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry* 302, 52-59.

Llop-Tous I, Barry CS, Grierson D. 2000. Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. *Plant Physiology* 123, 971-978.

Lozano R, Angosto T, Gomez P, Payan C, Capel J, Huijser P, Salinas J, Martinez-Zapater JM. 1998. Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of MADS-box genes. *Plant Physiology* 117, 91-100.

Ma H, dePamphilis C. 2000. The ABCs of floral evolution. *Cell* 101, 5-8.

Mapelli S. 1981. Changes in cytokinin in the fruits of parthenocarpic and normal tomatoes. *Plant Science Letters* 22, 227-233.

Mapelli S, Frova C, Torti G, Soressi GP. 1978. Relationship between set, development and activities of growth-regulators in tomato fruits. *Plant and Cell Physiology* 19, 1281-1288.

Marti C, Orzaez D, Ellul P, Moreno V, Carbonell J, Granell A. 2007. Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant Journal* 52, 865-876.

Martinelli F, Uratsu SL, Reagan RL, Chen Y, Tricoli D, Fiehn O, Rocke DM, Gasser CS, Dandekar AM. 2009. Gene regulation in parthenocarpic tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 60, 3873-3890.

Mazzucato A, Olimpieri I, Ciampolini F, Cresti M, Soressi GP. 2003. A defective pollen-pistil interaction contributes to hamper seed set in the parthenocarpic fruit tomato mutant. *Sexual Plant Reproduction* 16, 157-164.

## Bibliografía

Mazzucato A, Taddei AR, Soressi GP. 1998a. The parthenocarpic fruit (*pat*) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development* 125, 107-114.

Mazzucato A, Testa G, Biancari T, Soressi GP. 1999. Effect of gibberellic acid treatments, environmental conditions, and genetic background on the expression of the parthenocarpic fruit mutation in tomato. *Protoplasma* 208, 18-25.

Mezzetti B, Landi L, Pandolfini T, Spena A. 2004. The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnology* 4.

Moore S, Vrebalov J, Payton P, Giovannoni J. 2002. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *Journal of Experimental Botany* 53, 2023-2030.

Mounet F, Moing A, Garcia V, Petit J, Maucourt M, Deborde C, Bernillon S, Le Gall G, Colquhoun I, Defernez M, Giraudel JL, Rolin D, Rothan C, Lemaire-Chamley M. 2009. Gene and Metabolite Regulatory Network Analysis of Early Developing Fruit Tissues Highlights New Candidate Genes for the Control of Tomato Fruit Composition and Development. *Plant Physiology* 149, 1505-1528.

Nitsch JP. 1970. Hormonal factors in growth and development. En: Hulme AC. (ed.), *The biochemistry of fruits and their products*. Volume II. London, Academic Press, London, 427-472.

Nogler GA. 1984. Gametophytic apomixis. En: Johri BM. (ed.), *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, 475-518.

Nuez F, Costa J, Cuartero J. 1986. Genetics of the parthenocarpy for tomato varieties *Sub-arctic plenty*, *75/59* and *Severianin*. *Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung-Journal of Plant Breeding* 96, 200-206.

Nuez F, Cuartero J, Ferrando C, Catalá MS, Costa J. 1988. Genetic model for the inheritance of the parthenocarpy in the tomato line "75/59". An. Aula Dei 19, 7-11.

Nuez F. 1995. Desarrollo de nuevos cultivares. En: Nuez F. (ed.) El cultivo del tomate. Mundi-Prensa, Madrid, 625-670.

Olimpieri I, Siligato F, Caccia R, Mariotti L, Ceccarelli N, Soressi GP, Mazzucato A. 2007. Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. Planta 226, 877-888.

O'Neill SD. 1997. Pollination regulation of flower development. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48, 547-574.

Ozga JA, Reinecke DM. 2003. Hormonal interactions in fruit development. Journal of Plant Growth Regulation 22, 73-81.

Pandolfini T, Rotino G, Camerini S, Defez R, Spena A. 2002. Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. BMC Biotechnol 2 1.

Pascual L, Blanca JM, Canizares J, Nuez F. 2007. Analysis of gene expression during the fruit set of tomato: A comparative approach. Plant Science 173, 609-620.

Pascual L, Blanca JM, Canizares J, Nuez F. 2009. Transcriptomic analysis of tomato carpel development reveals alterations in ethylene and gibberellin synthesis during *pat3/pat4* parthenocarpic fruit set. BMC Plant Biology 9.

Pecaut P, Philouze J. 1978. A *sha-pat* line obtained by natural mutation. Tomato Genetics Cooperative Reports 28, 12.

## Bibliografía

- Peet MM, Sato S, Gardner RG. 1998. Comparing heat stress effects on male-fertile and male-sterile tomatoes. *Plant Cell and Environment* 21, 225-231.
- Peirson SN, Butler JN, Foster RG. 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research* 31.
- Philouze J, Maisonneuve B. 1978. Heredity of natural ability to set parthenocarpic fruits in the Soviet variety *Severianin*. *Tomato Genetics Cooperative Reports* 28, 12-13.
- Philouze J, Pecaut P. 1986. Natural parthenocarpy in tomato .3. study of parthenocarpy due to the *pat* (parthenocarpic fruit) gene in line Montfavet-191. *Agronomie* 6, 243-248.
- Philouze J, Milesi M. 1989. Parthénocarpié naturelle chez la tomate. IV. Etude de la parthénocarpié à déterminisme polygénique de la lignée "75/59". *Agronomie* 9 63-75
- Picken AJF. 1984. A review of pollination and fruit-set in the tomato (*Lycopersicon-esculentum Mill*). *Journal of Horticultural Science* 59, 1-13.
- Pnueli L, Carmel-Goren L, Hareven D, Gutfinger T, Alvarez J, Ganai M, Zamir D, Lifschitz E. 1998. The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development* 125, 1979-1989.
- Pnueli L, Hareven AD, Rounsley SD, Yanofsky MF, Lifschitz E. 1994a. ISolation of the tomato AGAMOUS gene TAG1 and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell* 6, 163-173.
- Pnueli L, Hareven D, Broday L, Hurwitz C, Lifschitz E. 1994b. The TM5 MADS box gene mediates organ differentiation in the 3 inner whorls of tomato flowers. *Plant Cell* 6, 175-186.
- Pressman E, Shaked R, Rosenfeld K, Hefetz A. 1999. A comparative study of the efficiency of bumble bees and an electric bee in pollinating unheated greenhouse tomatoes. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 74, 101-104.

Quinet M, Dubois C, Goffin MC, Chao J, Dielen V, Batoko H, Boutry M, Kinet JM. 2006. Characterization of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) mutants affected in their flowering time and in the morphogenesis of their reproductive structure. *Journal of Experimental Botany* 57, 1381-1390.

Rebers M, Kaneta T, Kawaide H, Yamaguchi S, Yang YY, Imai R, Sekimoto H, Kamiya Y. 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *Plant Journal* 17, 241-250.

Reimann-Philipp R. 1968. Die Ausnutzung des merkmals "Parthenokarpie" zur Züchtung extrem frühreifer Sorten bei der Tomate. *Arbeiten Max-planck-Institute für kulturpflanzenzüchtung. Vorträge hamburg* 4.12.1968, 15-36.

Roque EM. 2004. Análisis funcional y aplicaciones biotecnológicas del promotor del gen END1 de guisante (*Pisum sativum L.*). Tesis doctoral. Universidad politécnica de Valencia.

Rotino GL, Acciarri N, Sabatini E, Mennella G, Lo Scalzo R, Maestrelli A, Molesini B, Pandolfini T, Scalzo J, Mezzetti B, Spena A. 2005. Open field trial of genetically modified parthenocarpic tomato: seedlessness and fruit quality. *BMC Biotechnology* 5.

Rotino GL, Perri E, Zottini M, Sommer H, Spena A. 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnology* 15, 1398-1401.

Roth I. 1977. Fruits of angiosperms. En: Linsbauer K. (ed.), *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Gebrüder Borntraeger, Berlin, 675 p.

Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. 2003. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374-+.

## *Bibliografía*

Sasaki H, Yano T, Yamasaki A. 2005. Reduction of high temperature inhibition in tomato fruit set by plant growth regulators. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly* 39, 135-138.

Savidan Y. 2000. Apomixis: Genetics and breeding. *Plant Breeding Reviews* 18, 13–86.

Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* 37, 501-506.

Scott JW, George WL. 1984. Influence of pollination treatments on fruit-set and development in parthenocarpic tomato. *Hortscience* 19, 874-876.

Serrani JC, Fos M, Atares A, Garcia-Martinez JL. 2007. Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv micro-tom of tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* 26, 211-221.

Smith O. 1935. Pollination and life-history studies of the tomato. *Cornell University Agric. Exp. Sta. Men.* 184 3-6.

Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM. 1990. Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2, 755-767.

Soressi GP, Salamini F. 1975. A monomendelian gene inducing parthenocarpic fruits. *Tomato Genetic Cooperative Reports* 25, 22.

Spena A, Rotino GL. 2001. Parthenocarpy. A state of the art. En: Bhojwani SS, Soh WY. (ed.), *Current trends in the embriology of angiosperms*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 435-450.

Srivastava A, Handa AK. 2005. Hormonal regulation of tomato fruit development: A molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation* 24, 67-82.

Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster GTS, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ. 2007. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19, 2186-2196.

Teale WD, Paponov IA, Palme K. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 847-859.

Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF, Komeda Y. 1996. The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* 8, 735-746.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5116-5121.

Uzun S. 2006. The quantitative effects of temperature and light on the number of leaves preceding the first fruiting inflorescence on the stem of tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) and aubergine (*Solanum melongena* L.). *Scientia Horticulturae* 109, 142-146.

Vardy E, Lapushner D, Genizi A, Hewitt J. 1989a. Genetics of parthenocarpy in tomato under a low-temperature regime .1. Line RP 75/59. *Euphytica* 41, 1-8.

Vardy E, Lapushner D, Genizi A, Hewitt J. 1989b. Genetics of parthenocarpy in tomato under a low-temperature regime .2. Cultivar *Severianin*. *Euphytica* 41, 9-15.

Varga A, Bruinsma J. 1986. Tomato. En: Monselise SP. (ed.), *CRC Handbook of fruit set and development*. CRC Press, Boca Raton, 461-480.

Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P. 2000. Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends in Biotechnology* 18, 233-242.

## *Bibliografía*

Vriezen WH, Feron R, Maretto F, Keijman J, Mariani C. 2008. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist* 177, 60-76.

Wang H, Jones B, Li ZG, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latche A, Pech JC, Bouzayen M. 2005. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 17, 2676-2692.

Wang H, Schauer N, Usadel B, Frasse P, Zouine M, Hernould M, Latche A, Pech JC, Fernie AR, Bouzayen M. 2009. Regulatory Features Underlying Pollination-Dependent and -Independent Tomato Fruit Set Revealed by Transcript and Primary Metabolite Profiling. *Plant Cell* 21, 1428-1452.

Weiss D, Ori N. 2007. Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Plant Physiology* 144, 1240-1246.

Western TL, Burn J, Tan WL, Skinner DJ, Martin-McCaffrey L, Moffatt BA, Haughn GW. 2001. Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in arabidopsis. *Plant Physiology* 127, 998-1011.

Wittwer SH, Bukovac MJ, Sell HM, Weller LE. 1957. Some effects of gibberellin on flowering and fruit setting. *Plant Physiology* 32, 39-41.

Xiao H, Radovich C, Welty N, Hsu J, Li DM, Meulia T, van der Knaap E. 2009. Integration of tomato reproductive developmental landmarks and expression profiles, and the effect of SUN on fruit shape. *BMC Plant Biology* 9.

Yin ZM, Malinowski R, Ziolkowska A, Sommer H, Plader W, Malepszy S. 2006. The DefH9-iaaM-containing construct efficiently induces parthenocarpy in cucumber. *Cellular & Molecular Biology Letters* 11, 279-290.

Zhang XS, O'Neill SD. 1993. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination. *Plant Cell* 5, 403-418.

Zijlstra S. 1985. Parthenocarpie in tomaat; twee nieuwe lijnen uit soortkruising. *Zaabelangen* 4, 92-94.



## **VIII. ANEXOS**



**Anexo 1.** Artículo de investigación. Pascual L, Blanca JM, Canizares J, Nuez F. 2007. Analysis of gene expression during the fruit set of tomato: A comparative approach. *Plant Science* 173, 609-620.

**Anexo 2.** Genes identificados en la genoteca de sustracción, ordenados por número de clones.

**Anexo 3.** Genes diferencialmente expresados en *Arabidopsis* y su ortólogo en tomate.

**Anexo 4.** Artículo de investigación. Pascual L, Blanca JM, Canizares J, Nuez F. 2009. Transcriptomic analysis of tomato carpel development reveals alterations in ethylene and gibberellin synthesis during *pat3/pat4* parthenocarpic fruit set. *Bmc Plant Biology* 9.

**Anexo 5.** Genes diferencialmente expresados a lo largo del desarrollo del carpelo y cuajado del fruto en tomate (TIME).

**Anexo 6.** Genes diferencialmente expresados durante el cuajado del fruto y desarrollo del carpelo en la variedad partenocárpica (TIME RP75/59 y UC82vsRP75/59).

**Anexo 7.** Anotación del Affymetrix Tomato GeneChip Genome Array.

**Anexo 8.** Genes diferencialmente expresados en el cuajado partenocárpico del fruto ( eTIME RP75/59 y eUC82vsRP75/59).

**Anexo 9.** Datos de la F2 de la guía emasculada y no polinizada. Valores medios por planta.

\* Anexos en el CD adjunto.