



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA

Función del gen *SlSPT* en el desarrollo del fruto de tomate (*Solanum lycopersicum*) y su relación con citocininas

Tesis que presenta

Ing. A. I. Marisela Celso Espinoza

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de

Biología de Plantas

Director de la Tesis: **Dr. Stefan de Folter**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genómica Funcional del Desarrollo de Plantas, perteneciente a la Unidad de Genómica Avanzada del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN unidad Irapuato, bajo la asesoría del Doctor Stefan de Folter.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto (Beca No. 339440)

A la Unidad de Genómica Avanzada del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato, por proporcionar los recursos materiales y humanos necesarios para mi formación en éste posgrado.

Al Dr. Stefan de Folter por permitirme trabajar en su laboratorio, por su asesoría y paciencia durante mi estancia.

A los doctores Alfredo Cruz Ramírez y Neftalí Ochoa Alejo por formar parte del comité evaluador, así como, por las críticas constructivas y sugerencias para la realización de este trabajo.

A la M.C. Karla González Aguilera por su asesoría en la parte técnica durante mi estancia en el laboratorio.

A los Dres. Joanna Serwatowska y Ricardo Chávez, por su asesoría y excelente disposición para el desarrollo de este proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio de Genómica Funcional del Desarrollo de Plantas, por formar parte de esta experiencia.

DEDICATORIAS

Mi tesis la dedico con todo mi cariño y amor a mis padres Isaías e Isabel, por hacer todo lo posible para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme las armas para seguir adelante.

A mis hermanos Gustavo, Alejandro, Chabe, Rosita y Alfredo, con los que crecí y compartí alegrías, tristezas y enojos, gracias por estar siempre presentes.

A mis abuelitos, Beny y Jerónimo, por haber fomentado en mí el deseo de superación y anhelo de triunfo en la vida.

A todas esas personas importantes en mi vida, amigos y compañeros que siempre estuvieron listos para brindarme toda su ayuda.

A todos mis maestros que, en este andar por la vida influyeron con sus lecciones y experiencias en mi formación profesional.

Marisela Celso Espinoza

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.2. El tomate	3
2.2.1. Taxonomía.....	3
2.2.2. Características generales	3
2.2.3. Modelo de estudio.....	4
2.3. Desarrollo del fruto	4
2.3.1. Estructura del fruto de tomate.....	4
2.3.2. Desarrollo del fruto de tomate.....	6
2.4. Control génico del desarrollo del fruto	7
2.4.1. <i>SPT</i> regula el desarrollo del gineceo y fruto de <i>Arabidopsis</i>	9
2.5. Control hormonal del desarrollo del fruto	12
2.5.1. Citocininas implicadas en el desarrollo del fruto	14
3. OBJETIVOS.....	18
3.2. General.....	18
3.3. Específicos	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.2. Material vegetal.....	19
4.3. Histología	19
4.4. Microscopía óptica.	19
4.5. Extracción de ácidos nucleicos	20
4.6. Identificación de <i>SISPT</i> y reguladores de respuesta en tomate (<i>TRR</i>).....	20
4.7. Cuantificación de los niveles de expresión	20
4.8. Construcciones antisentido.....	21
4.9. Transformación genética de tomate.....	22
4.9.1. Obtención de plántulas y extracción de explantes de cotiledón.....	22
4.9.2. Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para la transformación.....	22

4.9.4.	Inducción de organogénesis	23
4.9.5.	Enraizamiento.....	23
4.9.6.	Aclimatación a invernadero	23
4.9.7.	Selección de plantas transformadas.....	24
4.9.8.	Comprobación del silenciamiento en plantas transformadas	24
4.9.9.	Análisis fenotípicos	24
4.10.	Tratamientos hormonales.....	24
5.	RESULTADOS	25
5.2.	Identificación del ortólogo de <i>SPT</i> en tomate	25
5.3.	Patrones de expresión de <i>SISPT1</i> y <i>SISPT2</i> durante el desarrollo del fruto de tomate.....	26
5.4.	Construcciones antisentido.....	28
5.5.	Transformación genética de tomate.....	29
5.5.1.	Confirmación del silenciamiento en plantas transformadas.....	30
5.5.2.	Análisis fenotípicos de plantas transformadas de tomate	31
5.6.	Morfología del ovario de tomate.....	33
5.7.	Patrón de fluorescencia de la línea reportera a citocininas <i>TCS::VENUS</i>	33
5.8.	Patrón de expresión de la línea reportera sintética <i>ARR5::GUS</i>	35
5.10.	Relación de los genes <i>SISPT1</i> , <i>SISPT2</i> y las citocininas	39
6.	DISCUSIÓN.....	42
7.	CONCLUSIONES	48
8.	PERSPECTIVAS.....	49
9.	BIBLIOGRAFÍA	50
10.	ANEXOS.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del gineceo y fruto de tomate.....	5
Figura 2. Desarrollo del fruto de tomate.....	7
Figura 3. Fenotipo de la mutante <i>spt-2</i>	10
Figura 4. Alineamiento de regiones conservadas de la proteína SPT y sus ortólogos..	11
Figura 5. Cambios hormonales que ocurren durante el desarrollo y maduración del fruto.	14
Figura 6. Vía de señalización de las citocininas en Arabidopsis.	16
Figura 7. Árbol filogenético basado en los dominios bHLH de las proteínas AtbHLHs (Arabidopsis) y SlbHLHs (tomate).	25
Figura 8. Alineamiento de las regiones conservadas de la proteína SPT y sus posibles ortólogos en tomate SISPT1 y SISPT2.	26
Figura 9. Patrones de expresión de <i>SISPT1</i> y <i>SISPT2</i> a lo largo del desarrollo del fruto de tomate.....	27
Figura 10. Diseño de construcciones en antisentido.....	28
Figura 11. Líneas transgénicas de tomate MT-Rg1.	30
Figura 12. Análisis de expresión mediante RT-PCR de plantas de tomate transformadas con la construcción antisentido <i>35S::SISPT2-AS</i>	31
Figura 13. Fenotipos observados en frutos de 20 dpa de plantas de tomate transformadas con <i>35S::SISPT2-AS</i>	32
Figura 14. Morfología del ovario de tomate de una planta silvestre en antesis.....	33
Figura 15. Patrón de fluorescencia de la línea reportera a citocininas <i>TCS::VENUS</i> en cortes transversales de botones florales y ovarios de tomate.	34
Figura 16. Señal de fluorescencia en secciones transversales de ovarios de tomate de la línea <i>TCS::VENUS</i> durante el desarrollo de placenta 48 h después de la aplicación exógena de citocininas con BAP 100 µM.	35
Figura 17. Patrón de expresión en secciones transversales de ovarios y anteras de botones florales de tomate de la línea <i>ARR5::GUS</i> en respuesta a la aplicación de citocininas exógenas.	36

Figura 18. Comparación de los patrones de fluorescencia en secciones transversales de botones florales y ovarios de tomate de las líneas marcadoras de señalización a citocininas <i>TCS::VENUS</i> y auxinas <i>DR5::VENUS</i>	38
Figura 19. Cuantificación de la expresión relativa por RT-PCR de los <i>TRR</i> en flores de tomate en antesis 24 h después de la aplicación de BAP 100 µM.	40
Figura 20. Cuantificación de la expresión relativa por RT-PCR de los <i>TRR</i> en flores de tomate en antesis 48 h después de la aplicación de BAP 100 µM.	40
Figura 21. Análisis de expresión de <i>SISPT1</i> y <i>SISPT2</i> en respuesta a los niveles endógenos y exógenos de citocininas.	41

ÍNDICE DE TABLAS Y ANEXOS

Tabla 1. Número de plantas de tomate regeneradas y transformadas obtenidas para cada gen.....	29
Tabla 2. Número de semillas y lóculos en secciones transversales de frutos 20 dpa de tres líneas diferentes <i>35S::SISPT2-AS</i> y plantas silvestres.....	32
ANEXO 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes <i>SISPT1</i> , <i>SISPT2</i> y los <i>TRR</i>	56
ANEXO 2. Medios de cultivo utilizados en la transformación genética de tomate.	57
ANEXO 3. Motivos de unión de citocininas a los promotores de <i>SISPT1</i> y <i>SISPT2</i>	57

1. RESUMEN

En el trabajo que se presenta a continuación se buscó dilucidar la función del gen *SISPT* durante el desarrollo del fruto de tomate. *SISPT* es un ortólogo de *SPT* de *Arabidopsis*, el cual es responsable de la formación de tejidos del gineceo en etapas tempranas de desarrollo del fruto. Análisis con “Blast” indicaron la existencia de dos posibles ortólogos de *SPT* en tomate: *SISPT1* y *SISPT2*. Sin embargo, los análisis de expresión mostraron que *SISPT2* podría no ser ortólogo de *SPT*, sino a *ALC*, un gen que actúa de manera redundante con *SPT* durante el desarrollo del gineceo en *Arabidopsis*. La expresión de *SISPT1* y *SISPT2* en las mismas etapas de desarrollo, sugiere que ambos genes podrían actuar de manera redundante durante el desarrollo del ovario y fruto de tomate. Las citocininas son hormonas vegetales involucradas en procesos de división celular. Recientemente se estableció una relación entre la vía de señalización de citocininas y *SPT* en *Arabidopsis*. Análisis de la respuesta transcripcional a citocininas durante el desarrollo del fruto de tomate indicaron que las citocininas podrían desempeñar un papel importante durante el desarrollo de placenta, y junto con auxinas desempeñar un papel complementario en la formación de óvulos. Adicionalmente, se observó un comportamiento conservado de los reguladores de respuesta de la vía de señalización de citocininas entre tomate y *Arabidopsis*. Análisis de expresión de *SISPT1* y *SISPT2* indicaron que ambos genes no son afectados por los niveles endógenos o exógenos de citocininas, a pesar de que en los promotores de ambos genes existen motivos de unión a esta hormona, lo cual sugiere que el modelo de regulación establecido en *Arabidopsis* tal vez no se encuentre conservado, y quizá sea otro mecanismo a través del cual *SISPT* pueda estar relacionado con las citocininas durante el desarrollo temprano del fruto en tomate.

ABSTRACT

In this work it was sought elucidate the function of *SISPT* during tomato fruit development. *SISPT* is orthologue to *SPT* in Arabidopsis, which is responsible for the formation of gynoecium tissues in early stages of fruit development. Blast analysis indicated the existence of two possible orthologous in tomato: *SISPT1* and *SISPT2*. However, expression analysis showed that *SISPT2* could not be orthologue to *SPT*, if not *ALC*, a gene acts redundantly with *SPT* during Arabidopsis gynoecium development. *SISPT1* and *SISPT2* expression at the same stages of development, suggesting that both genes could act redundantly during ovary and tomato fruit development. Cytokinin is a plant hormone important for cell division. Recently it has been found transcriptional response to this hormone in the medial domain of the Arabidopsis gynoecium and results indicate the importance of this hormone during its development. Furthermore, a relation between cytokinin signaling and the transcription factor *SPT* has been established. Analysis of the transcriptional response to cytokinins during tomato fruit development indicated that cytokinin could play an important role during placenta development, and together with auxin play a complementary role in ovules formation. Additionally, preserved behavior of response regulators of cytokinin signaling pathway was observed between tomato and Arabidopsis. *SISPT1* and *SISPT2* expression analysis indicated that both genes are not affected by endogenous or exogenous cytokinin levels, although in the promoters of both genes exist binding motifs this hormone. Suggesting that the regulatory model established in Arabidopsis may not be conserved, and perhaps another mechanism through which *SISPT* could be related to cytokinin during early fruit development in tomato.

2. INTRODUCCIÓN

2.2. El tomate

2.2.1. Taxonomía

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta dicotiledónea oriunda de las zonas templadas de América que pertenece a la familia de las solanáceas. Esta familia comprende aproximadamente 98 géneros y 2700 especies, varias de ellas de importancia agronómica, que son cultivadas principalmente para la obtención de sus frutos (Knapp, 2002). La clasificación taxonómica de tomate es la siguiente:

REINO: Plantae

Subreino: Traqueobinta

Superdivisión: Spermatophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Suborden: Solanineae

Familia: *Solanaceae*

Género: *Solanum*

Especie: *S. lycopersicum*

2.2.2. Características generales

El tomate es una planta herbácea de tamaño muy variable, desde 30 cm a 1.5 m dependiendo de la variedad, puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta con crecimiento limitado (determinado) o ilimitado (indeterminado). Su sistema radicular está compuesto por una raíz principal corta y numerosas raíces secundarias. En el tallo principal se desarrollan hojas e inflorescencias. Las hojas son compuestas e imparipinadas con foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado. Las inflorescencias denominadas dicasio son de tipo racemoso y se componen de 3 a 7 flores. La flor es hermafrodita, perfecta e hipógina y consta del mismo número de sépalos que de pétalos. Los estambres, que se desarrollan fusionados formando un cono estaminal, envuelven al ovario a partir del cual se desarrolla el fruto.

2.2.3. Modelo de estudio

En los últimos años, el tomate ha servido como un modelo de referencia para el estudio del desarrollo de frutos carnosos, genética, patología y fisiología vegetal, debido a ciertas ventajas que incluyen: un ciclo de vida corto, alta tasa de multiplicación y autopolinización, además de que su genoma ha sido secuenciado (Lozano *et al.*, 2009; Tomato Genome, 2012). También gran cantidad de mutantes se encuentran disponibles para la detección e identificación de genes por herramientas de genética reversa (Okabe *et al.*, 2011). Asimismo, el análisis funcional de genes candidatos puede ser fácilmente conducido ya que el tomate es altamente adecuado para la transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* y susceptible a la expresión de genes de manera transitoria vía agroinyección (Orzaez *et al.*, 2006). Además, la represión de genes blanco puede ser obtenida por silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS) (Orzaez *et al.*, 2009) o por edición de genomas mediante el sistema CRISPR/Cas9 (Azzi *et al.*, 2015).

2.3. Desarrollo del fruto

El fruto es un órgano específico de las angiospermas derivado del ovario maduro de la flor, cuya función principal es proteger a las semillas durante su desarrollo hasta su dispersión (Seymour *et al.*, 2013).

Los frutos muestran una amplia variedad de formas, tamaños, consistencias, y una gran diversidad de perfiles bioquímicos y metabólicos que los hacen una fuente rica de alimento y nutrientes (Kourmpetli y Drea, 2014). La mayoría de los frutos pueden ser clasificados por su morfología (secos o carnosos), estrategia de dispersión (dehiscentes o indehiscentes) y número de carpelos, éstos últimos constituyen al órgano más importante: el gineceo, el cual provee información que permite asociar características morfológicas y anatómicas con mecanismos genéticos conservados (Karlova *et al.*, 2014).

2.3.1. Estructura del fruto de tomate

El fruto se origina a partir del gineceo o pistilo. En tomate este órgano se compone de tres partes: en la parte superior se encuentra el estigma, un tejido compuesto de

células especiales llamadas “papilas estigmáticas” donde llega el polen antes de la germinación. El estilo, un cilindro que conecta al estigma con el ovario. A lo largo del estilo se encuentra el tracto de transmisión, un tejido a través del cual crecen los tubos polínicos que conducen al polen hasta los óvulos para su fecundación. Y el ovario, donde se encuentran los óvulos que darán lugar a las semillas tras la fertilización (Xiao *et al.*, 2009; Figura 1 A).

El fruto de tomate es una baya de forma sub-esférica, globosa o alargada, habitualmente de 2 a 8 cm de diámetro, dependiendo de la variedad. El fruto maduro de tomate está constituido básicamente por el pericarpio, tejido locular, placenta y semillas (Figura 1 B). Al pericarpio lo componen la pared externa, las paredes radiales o septos que dividen al fruto en dos o más lóculos y una pared interna o columela. El pericarpio se origina de la pared del ovario y consta de un exocarpo o piel, un mesocarpo parenquimático con haces vasculares y el endocarpo constituido por una capa unicelular que rodea a los lóculos. Los lóculos son cavidades en el pericarpio que contienen a las semillas, las cuales son unidas a la placenta y cubiertas por un tejido locular (Serrani, 2008).

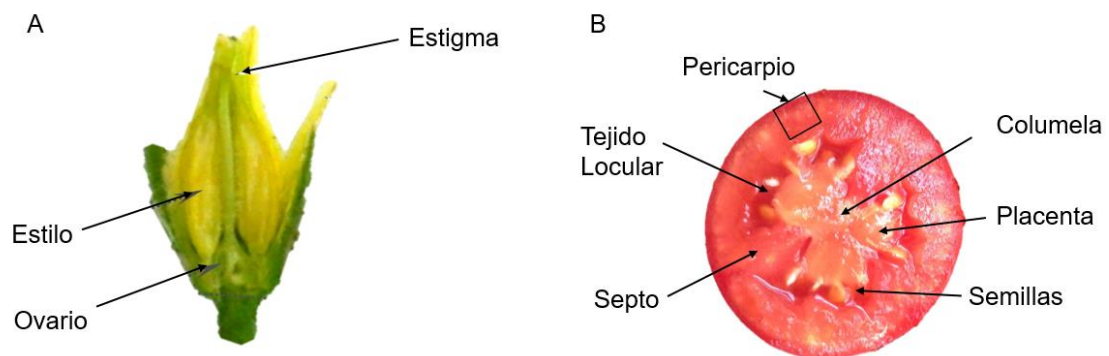


Figura 1. Estructura del gineceo y fruto de tomate. A) Corte longitudinal de una flor de tomate, se observa el gineceo compuesto de estilo, estigma y ovario. B) Corte transversal de un fruto de tomate 40 días posterior a antesis (dpa). Se observan el pericarpio, los septos, las semillas en contacto con la placenta rodeadas de tejido locular, y en el eje central la columela.

2.3.2. Desarrollo del fruto de tomate

En tomate, el desarrollo del fruto puede dividirse en cuatro etapas (Figura 2). La primer etapa involucra el desarrollo del gineceo y la decisión de abortar o proseguir con el desarrollo del fruto. Durante el desarrollo del gineceo ocurre la formación de los tejidos internos del ovario: óvulos y placenta, la formación y crecimiento del estilo, y el desarrollo de las células del estigma. De manera paralela ocurre el desarrollo de los demás órganos de la flor, los cuales incluyen: estambres, sépalos y pétalos (Xiao *et al.*, 2009). Esta etapa culmina con la reanudación del crecimiento de los órganos de la flor, produciéndose la antesis, donde las flores se abren y las anteras de los estambres mueren permitiendo la caída de los granos de polen en el estigma ocurriendo así la polinización y la posterior fecundación de los óvulos. Una exitosa polinización y fecundación dará lugar al desarrollo del fruto, lo cual permite al ovario pasar de una condición estática a un rápido crecimiento (Gillaspy *et al.*, 1993).

La segunda etapa describe el crecimiento temprano del fruto debido a la división celular y el desarrollo temprano del embrión. En tomate cv. Micro-Tom, la división celular periclinal y anticlinal comienza a los 2 dpa cuando el fruto tiene 1 mm de diámetro y cesa a los 10-13 dpa (Seymour *et al.*, 2013). Durante esta etapa la actividad mitótica es mayor en la parte externa del pericarpio y en la periferia de la placenta, región de donde se deriva el tejido locular (Gillaspy *et al.*, 1993).

En la siguiente etapa, el fruto continua su crecimiento a través de la expansión celular hasta lograr su tamaño final (Xiao *et al.*, 2009). En el fruto de tomate, el volumen de las células de la placenta, tejido locular y mesocarpo pueden incrementar más de 10 veces su tamaño, mientras que las células que componen al exo y endocarpo lo hacen en menor medida. Durante este período, el embrión se desarrolla a partir de una estructura globular a un embrión bilateral que muestra cotiledones bien desarrollados y un eje radicular bien establecido. Sin embargo, las semillas no crecen en proporción directa al fruto pues no incrementan su tamaño de forma paralela al mismo (Gillaspy *et al.*, 1993).

La cuarta y última fase corresponde a la maduración, un proceso que involucra cambios químicos y estructurales que determinan el color, aroma, textura y composición bioquímica final del fruto, haciéndolo más atractivo para su dispersión. (Giovannoni, 2001).

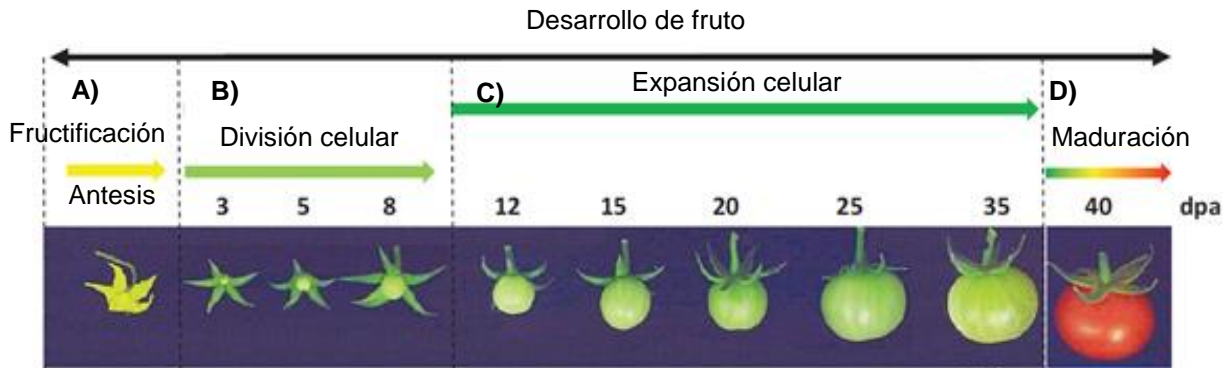


Figura 2. Desarrollo del fruto de tomate. A) Desarrollo del ovario que culmina con la polinización y fecundación en la antesis, dando lugar a fructificación. B) Etapa de división celular. C) Expansión celular y crecimiento final del fruto. D) Maduración del fruto. Adaptado de (Azzi *et al.*, 2015).

Como se describió anteriormente, el desarrollo del fruto es un proceso altamente coordinado en el cual influyen diversos factores que determinan el tamaño final del fruto. Este proceso es regulado a nivel molecular, mediante una interacción compleja de cambios en la expresión génica, eventos de señalización, y actividad hormonal (Pattison *et al.*, 2015).

2.4. Control génico del desarrollo del fruto

Se ha reportado que las especies que producen frutos secos son ancestros de especies que producen frutos carnosos (Knapp, 2002), lo cual nos permite sugerir que los mecanismos de desarrollo y regulación en ambos tipos de frutos podrían encontrarse conservados.

En la planta modelo *Arabidopsis*, la cual genera una silicua dehiscente (fruto seco), las redes regulatorias involucradas en el desarrollo del fruto han sido ampliamente investigadas mediante la identificación de factores de transcripción clave en el

desarrollo del carpelo y fruto. De manera similar, estudios en tomate, un modelo de estudio de frutos carnosos, han provisto información de las redes responsables del control de la maduración y desarrollo temprano del fruto.

Los genes MADS-box fueron los primeros genes investigados en el desarrollo del ovario y fruto de tomate. *TDR4* y *MBP7* son ortólogos de *FRUITFULL (FUL)*, un gen de tipo MADS-box en *Arabidopsis* (Bemer *et al.*, 2012). *FUL* es necesario para la diferenciación de las valvas en el fruto y es un regulador negativo de *SHATTERPROOF 1 y 2 (SHP1/SHP2)*, *INDEHISCENT (IND)* y *ALCATRAZ (ALC)* (Liljegren *et al.*, 2004), genes que promueven la dehiscencia. En tomate *TDR4* y *MBP7* son expresados tempranamente en el desarrollo del meristemo floral y durante la maduración del fruto, donde se ha observado que *TDR4* actúa como un represor de la separación celular en el pericarpio (Seymour *et al.*, 2002) indicando un papel análogo al de *FUL* en *Arabidopsis*.

Otros miembros de la familia MADS-box, como *TOMATO MADS BOX (TM29 o TAGL2)*, *TOMATO AGAMOUS-LIKE1 y 11 (TAGL1 y TAGL11)*, también son expresados en estadios de desarrollo floral y en ovario después de la antesis. La co-supresión o expresión antisentido de *TAGL2*, un gen homólogo a *SEPALLATA (SEP)* resulta en alteraciones en los verticilos de la flor, principalmente en carpelo, sugiriendo un papel importante en el desarrollo de este órgano (Busi *et al.*, 2003).

TAGL1 es un ortólogo de los genes duplicados *SHP1* y *SHP2* de *Arabidopsis*, los cuales actúan de manera redundante para especificar la identidad de los márgenes de las valvas y zona de dehiscencia del fruto (Liljegren *et al.*, 2004). *TAGL1* es expresado en óvulos, carpelo y en el pericarpio de frutos durante la maduración (Matas *et al.*, 2011). La supresión de *TAGL1* provoca una reducción en el grosor del pericarpio de frutos e inhibe su maduración, sugiriendo un papel importante durante este proceso (Vrebalov *et al.*, 2009). De manera similar, *TAGL11*, un ortólogo de *SEEDSTICK (STK)*, es expresado en el tegumento de los óvulos y paredes del carpelo (Busi *et al.*, 2003).

Además de los genes de tipo MADS-box, miembros de diferentes familias de factores de transcripción como *CRABS CLAW (CRC)* de la familia YABBY, *SPATULA (SPT)*

de tipo bHLH y ETTIN (ETT) un factor de transcripción de respuesta a auxinas, se han encontrado implicados en la morfogénesis del carpelo de *Arabidopsis* (Heisler *et al.*, 2001; Alvarez y Smyth, 2002). Mutantes *crc* muestran defectos en el desarrollo del gineceo y en la fusión de los carpelos en la parte apical generando estructuras cortas y anchas (Alvarez y Smyth, 2002). *ETT*, por su parte controla el patrón apico-basal del gineceo controlando la posición de los límites radiales. Mutantes *ett* casi no tienen tejido de las valvas dentro del ovario; en su lugar producen un estilo similar a un ginoforo coronado por un estigma bifurcado (Heisler *et al.*, 2001). Se ha reportado que tanto *CRC* como *ETT* actúan en paralelo con *SPT* para especificar todos los componentes del gineceo maduro (Alvarez y Smyth, 2002).

2.4.1. *SPT* regula el desarrollo del gineceo y fruto de *Arabidopsis*

El patrón de expresión de *SPT* es detectado en la iniciación y desarrollo de las regiones medias del gineceo, en el estilo y estigma, aunque también ocurre en subregiones de óvulos en desarrollo y en la pared y zona de dehiscencia de frutos maduros (Heisler *et al.*, 2001), donde al parecer actúa de manera redundante con otros genes de la misma familia (Groszmann *et al.*, 2011).

Mutaciones recesivas en *SPT* interrumpen el desarrollo de tejidos del margen del carpelo: septum, estigma, estilo, y tracto de transmisión (Figura 3 D-G) Sin embargo, el único tejido ausente es el tracto de transmisión dentro del septum y estilo, el cual genera una matriz extracelular que facilita la fecundación. A pesar de la ausencia de este tejido la fecundación ocurre, aunque con menor frecuencia, generándose así frutos de menor tamaño, menor número de semillas y más amplios en la región media resultando en una apariencia similar a una espátula (Alvarez y Smyth, 2002; Figura 3 A-C).

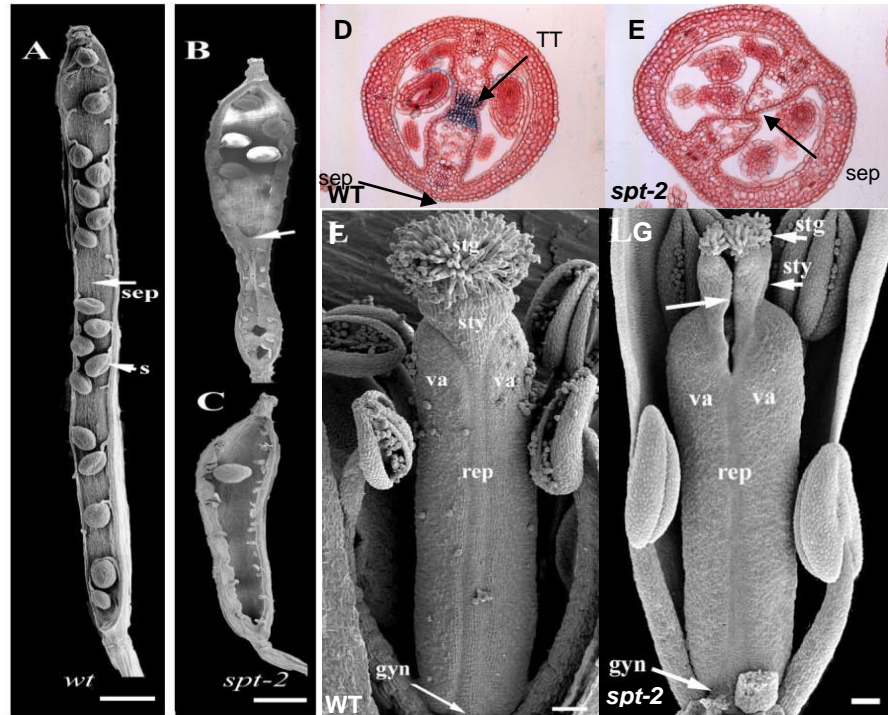


Figura 3. Fenotipo de la mutante *spt-2*. A-C) Silicuas maduras de Arabidopsis. Se puede apreciar una disminución drástica del tamaño y número de semillas en la mutante *spt-2*. D) Corte transversal de un gineceo silvestre de Arabidopsis; la región teñida de azul corresponde al tracto de transmisión. E) Corte transversal de un gineceo de *spt-2*; hay ausencia de tracto de transmisión en la fusión del septum. F) Estructura de un gineceo silvestre de Arabidopsis. G) Estructura de un gineceo de *spt-2* sin fusionar en el estilo y con menor cantidad de papilas estigmáticas. s= semillas, sep=septum, TT=tracto de transmisión, stg= estigma, sty= estilo, va=valvas, rep=replum, gyn=ginoforo (Modificado de Alvarez y Smyth, 2002).

SPT codifica a un factor de transcripción de tipo “basic hélix-loop-hélix” (bHLH) (Heisler *et al.*, 2001). Esta familia es definida por el dominio bHLH, el cual consiste de 62 aminoácidos con dos regiones funcionalmente distintas. La región básica constituida de 15 aminoácidos con un alto número de residuos básicos está localizada en el extremo N-terminal del dominio y está involucrada en la unión al DNA, mientras que la región HLH en el extremo C-terminal funciona como un dominio de dimerización (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Figura 4B). Adicionalmente, dos dominios

estructurales han sido revelados; una hélice anfipática y un dominio ácido; este último esencial para la función de *SPT* en el carpelo. Ambos dominios se encuentran conservados en el ortólogo *SISPT* en tomate el cual puede restaurar la función del carpelo en mutantes *spt-2* de *Arabidopsis*, lo cual sugiere que puede existir una función conservada entre ambas especies (Grozsmann *et al.*, 2008; Figura 4 A).

A

		Amphipathic helix		Acidic domain	
AtSPT	M--45--	DEISQFLRHIF	--103--	ETDEYDCESEEGGE	--19--
GhSPT	---7--	DDISNLLHQIL	---54--	DTDEYDCESEEGIE	--17--
CcSPT	M--15--	EEISSFLNQFI	---45--	AVDSDTNDEKGPD	--17--
FaSPT	M--32--	DEISLFLQIIL	---66--	EADYDCESEEGLE	--16--
MtSPT	M--13--	DEISLFLHQIL	---50--	DTDEYDCESEEGVE	--18--
GmSPT	M--13--	DEISLFLRQIL	---80--	ENDDYDCESEEGVE	--17--
PtSPT	M--12--	EEISTFLHQLL	---69--	DLGDFSCDSEKQVE	--12--
VvSPT	M--21--	DEISLFLHQIL	---71--	DLDEYDCESEEGLE	--17--
SISPT	M--21--	DDISVFLRHIL	---75--	DPDEYECESEDGTE	--16--
EcSPT	M--22--	DDISLFLQHFL	--121--	DLDDYDCESEEGFE	--15--
OsbHLH107	M-----				-----49-----
OsbHLH108	M-----				-----98-----
PgSPT	M-----				-----151-----

B

	NLS	Basic	NLS	Helix	Loop	Helix	Beta strand	
AtSPT	KRCR	AAEVHNLSE	KRRR	SRINEKMKALQSLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLTM		--118--*
GhSPT	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	SRINEKMKALQNLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLSM		--145--*
CcSPT	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	SRINEKMKALQNLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLTM		--140--*
FaSPT	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	SRINEKMKALQNLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLSM		---96--*
MtSPT	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	SRINEKMKALQNLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLSL		---175--*
GmSPT	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	SRINEKMKALQNLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLSM		---183--*
PtSPT	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	SRINEKMKALQNLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLTM		---129--*
VvSPT	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	SRINEKMKALQNLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLSM		---98--*
SISPT	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	SRINEKMKALQKLIIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLTM		---178--*
EcSPT	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	SRINEKMKALQNLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLSM		---185--*
OsbHLH107	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	SRINEKMKALQSLIPNSSKTDKASMLDDAIEYLKQL		QLQVQMLSM		---208--*
OsbHLH108	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	SKINEKMKALQSLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLSM		---154--*
PgSPT	KRSR	AAEVHNLSE	KRRR	NRINEKMKALQNLIPNSNKTDKASMLDEAIEYLKQL		QLQVQMLSA		---119--*

Figura 4. Alineamiento de regiones conservadas de la proteína SPT y sus ortólogos. Ortólogos de la proteína SPT identificados en bases de datos basado en las identidades más cercanas de 62 aminoácidos conservados de la región bHLH. En la parte superior, hélice anfipática y dominio ácido alfa helical. En azul, ortólogo SISPT de tomate con 60/62 residuos idénticos conservados (Grozsmann *et al.*, 2008).

Además de la interacción con otros factores de transcripción, SPT parece regular la acción de hormonas durante el desarrollo del gineceo en *Arabidopsis*. Moubayidin y Østergaard (2014) demostraron que *SPT* controla la radialidad en el ápice del gineceo mediante el control del transporte de auxinas, lo cual nos sugiere que la interacción entre genes y hormonas es necesaria para que el desarrollo de fruto se lleve a cabo.

2.5. Control hormonal del desarrollo del fruto

Al igual que en muchos procesos de desarrollo en plantas, las hormonas juegan un papel importante durante el desarrollo del fruto. A través de la sincronización de la señal entre las semillas en desarrollo y los tejidos que las rodean, las hormonas regulan cada etapa de desarrollo del fruto (McAtee *et al.*, 2013). Sin embargo, las funciones relativas de cada hormona no son restringidas a una etapa en particular, y una red compleja de más de una hormona está involucrada en controlar varios aspectos de desarrollo del fruto (Kumar *et al.*, 2014).

Después de la polinización, la fructificación se logra a través de la des represión del crecimiento y la activación de la división celular vía la acción de auxinas, citocininas y giberelinas (Mariotti *et al.*, 2011) (Figura 5). Se ha demostrado que ninguna de estas hormonas puede iniciar el desarrollo del fruto de manera individual, sin embargo, la aplicación combinada de ellas puede inducir el crecimiento del fruto normal, incluso en ausencia de fertilización (Gillaspy *et al.*, 1993), indicando que la interacción entre estas hormonas es necesaria para la fructificación y crecimiento del fruto.

Evidencia sugiere que las auxinas y giberelinas actúan de manera similar durante la fructificación en frutos secos y carnosos. En *Arabidopsis* el desarrollo del fruto inducido por auxinas ocurre solamente a través de la activación de la señalización de giberelinas de la siguiente manera: las auxinas sintetizadas en los óvulos durante la fecundación son transportadas al pericarpio donde inducen la síntesis de giberelinas, de esta manera las giberelinas sintetizadas en el pericarpio permitirán el crecimiento (Dorcey *et al.*, 2009; McAtee *et al.*, 2013). De manera similar ocurre en tomate donde durante la fecundación la biosíntesis de auxinas es activada en ovarios. Un aumento en los niveles de auxinas resulta en la activación del metabolismo de giberelinas, un incremento en los niveles de citocininas y un decremento en ácido abscísico (Mariotti *et al.*, 2011; McAtee *et al.*, 2013).

El desarrollo de las semillas y el fruto son procesos conectados y sincronizados. Ha sido bien establecido que las semillas son una fuente rica de hormonas, particularmente auxinas y giberelinas (Kumar *et al.*, 2014). Reportes previos en

tomate, han demostrado que las auxinas presentes en semilla y la capa exterior de la placenta promueven la expansión celular del tejido que las rodea llenando así la cavidad locular (Pattison y Catala, 2012). Adicionalmente se ha observado que los niveles de auxinas incrementan durante el desarrollo de la semilla (Kumar *et al.*, 2014).

También se ha observado que, durante la fase de expansión celular del fruto de tomate, proteínas relacionadas con pared celular, transporte de azúcares y varias enzimas glicolíticas son reguladas por auxinas y giberelinas. El ácido abscísico (ABA) también ha sido asociado con la fase de expansión celular en tomate. Mutantes deficientes en ABA muestran un reducido tamaño de fruto (Nitsch *et al.*, 2009). Por otra parte, poco se ha investigado del papel de los brasinoesteroides durante el desarrollo de fruto, aunque también podrían desempeñar un papel importante en la fructificación y crecimiento del fruto; sin embargo, la interacción con otras hormonas no ha sido investigada (McAtee *et al.*, 2013).

Una vez que las semillas han alcanzado su madurez, lo cual coincide cuando el fruto ha logrado su tamaño final (Xiao *et al.*, 2009) se da un cambio importante en los niveles de hormonas, involucrando un decremento en auxinas, citocininas y giberelinas y un simultáneo incremento de ácido abscísico y etileno (Figura 5). Éstos últimos han sido involucrados con los cambios bioquímicos que tienen lugar durante la maduración (McAtee *et al.*, 2013).

Aunque se considera que las citocininas juegan un papel crítico en la estimulación de la división celular (Srivastava y Handa, 2005), muy pocos datos experimentales soportan el involucramiento de esta hormona en etapas tempranas del desarrollo del gineceo y fruto (Mariotti *et al.*, 2011).

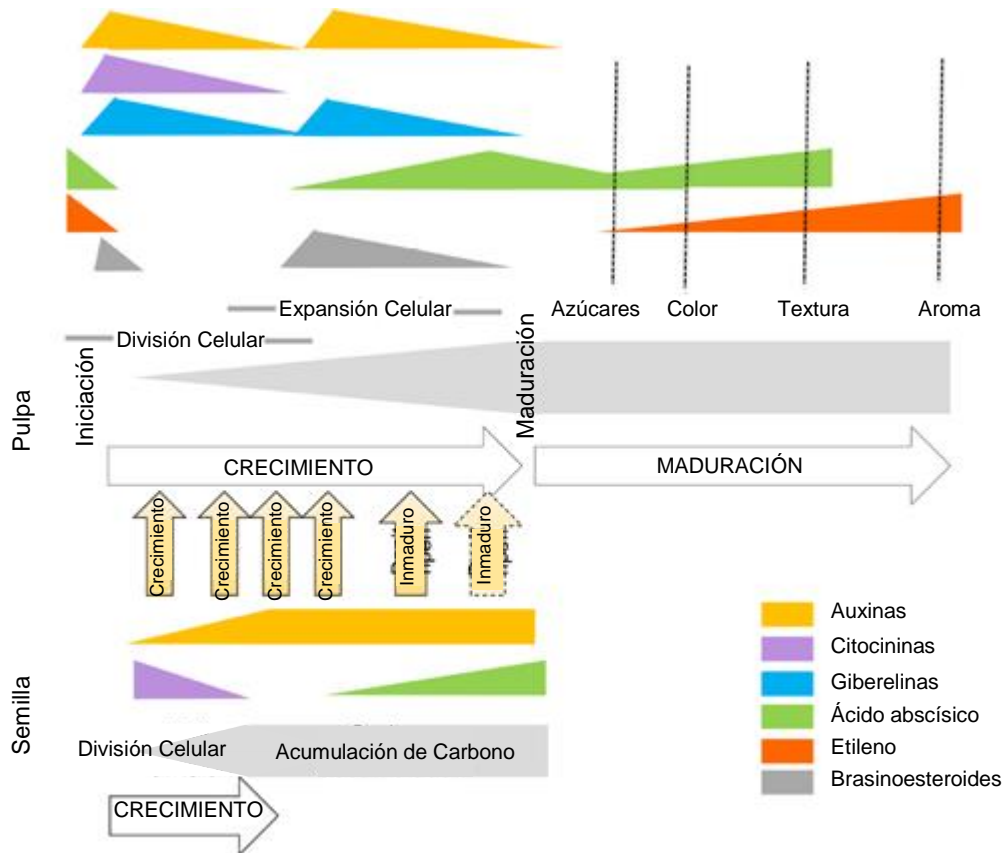


Figura 5. Cambios hormonales que ocurren durante el desarrollo y maduración del fruto. Concentraciones diferenciales de hormonas ocurren en la semilla y los tejidos que las rodean. Se observa que se requiere un incremento en auxinas, citocininas y giberelinas para la división celular, y la acción de auxinas, giberelinas y brasinoesteroides para el crecimiento del fruto. Cuando se alcanza la maduración hay una inhibición de transporte de auxinas en semillas y un incremento de ácido abscísico, lo que desencadena la maduración, la senescencia y un incremento en la biosíntesis de etileno y ácido abscísico (McAtee *et al.*, 2013).

2.5.1. Citocininas implicadas en el desarrollo del fruto

En estudios previos en *Arabidopsis* se mostró que las citocininas juegan al menos dos papeles durante el desarrollo del fruto: un papel temprano induciendo proliferación de tejido en la región media del gineceo en desarrollo y uno tardío

durante la formación de los márgenes de las valvas del fruto, donde al parecer juegan un papel complementario con auxinas en el desarrollo de tejidos específicos del gineceo (Marsch-Martínez *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha reportado un papel importante de las citocininas en el crecimiento de la placenta y en el número de óvulos en el gineceo de *Arabidopsis* (Bartrina *et al.*, 2011).

En tomate, las citocininas son encontradas en el pericarpio, donde son asociadas con procesos de división celular (Gillaspy *et al.*, 1993). También se ha observado que los niveles de citocininas en ovario incrementan después de la polinización (Matsuo *et al.*, 2012), sugiriendo que su participación se requiere para el adecuado crecimiento del fruto (McAtee *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que la interacción con giberelinas y auxinas a través de la modulación de la expresión de genes de la vía metabólica, permite el desarrollo de frutos partenocárpicos (Ding *et al.*, 2013), lo cual sugiere un papel importante durante la fructificación. Sin embargo, el papel de esta hormona en etapas más tempranas de desarrollo y su regulación para llevar a cabo los procesos en los que está implicada aún se desconoce.

En los últimos años, se ha establecido un modelo de la vía de señalización de citocininas en plantas (El-Showk *et al.*, 2013). En este modelo, la unión de un sensor del receptor histidin-cinasa (HK, siglas en inglés) a citocininas inicia una multi-etapa de fosforilación. Tras la fosforilación, el receptor “HK” transfiere el grupo fosforilo a una proteína fosfotransferasa que contiene una histidina (HP, siglas en inglés), la cual entonces transfiere el fosfato a uno de los dos tipos de reguladores de respuesta (RR) localizados en el núcleo. Los RR de tipo B, son factores de transcripción que activan la expresión de genes blanco involucrados en procesos regulados por citocininas, mientras que los RR de tipo A actúan como parte de un “loop” de control que regula este proceso (El-Showk *et al.*, 2013; Figura 6).

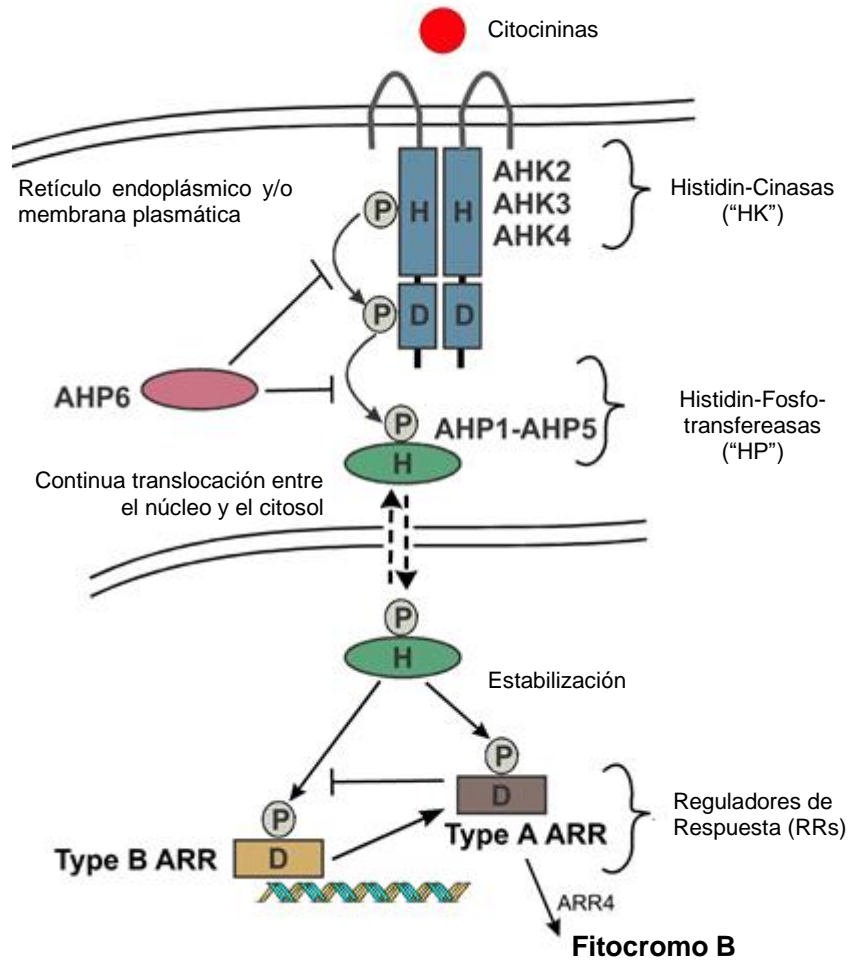


Figura 6. Vía de señalización de las citocininas en Arabidopsis. Las citocininas se unen a los receptores histidin-cinasas (AHK, siglas en inglés) localizados en el retículo endoplásmico induciendo cambios conformacionales que desencadenan la fosforilación. Un grupo fosforilo (P) es entonces transferido de un residuo conservado de histidina (H) a uno de Aspartato (A) de las proteínas histidin-fosfotransferasas (AHP, siglas en inglés). Las AHP translocan continuamente entre el citosol y el núcleo, fosforilando a los reguladores de respuesta (ARRs, siglas en inglés). Los ARR tipo A se estabilizan tras la fosforilación y regulan negativamente a la vía, en tanto que los ARR tipo B pueden unirse a DNA e iniciar la transcripción de genes en respuesta a citocininas (El-Showk *et al.*, 2013).

Tal como se ha descrito anteriormente, el desarrollo del fruto es el resultado de una interacción compleja de cambios en la expresión génica y la actividad hormonal. Previamente se ha encontrado que *SPT*, un gen involucrado en la morfogénesis del gineceo en *Arabidopsis*, interactúa con la vía de señalización de citocininas a través de la regulación de los RR de tipo B (Stefan de Folter, com. personal).

Adicionalmente, se ha demostrado que los mecanismos de regulación entre diferentes especies no parecen ser tan diferentes (Knapp, 2002). Por lo que el trabajo que aquí se presenta se basa en determinar si la función de *SPT* y el mecanismo de regulación con la vía de señalización de citocininas en *Arabidopsis* que produce un fruto seco, se encuentra conservado en tomate, un modelo de fruto carnoso.

HIPÓTESIS:

SISPT y citocininas son implicadas en el desarrollo temprano del fruto de tomate, y son relacionados durante este proceso.

3. OBJETIVOS

3.2. General

Investigar la función del gen *SISPT* y de las citocininas en el desarrollo del fruto de tomate, y determinar la relación entre ambos.

3.3. Específicos

- Identificar el gen *SISPT* en tomate y analizar sus niveles de expresión durante el desarrollo del fruto.
- Determinar la función del gen *SISPT* mediante silenciamiento génico.
- Determinar la respuesta transcripcional a citocininas y auxinas durante el desarrollo del fruto mediante el estudio del patrón de expresión de líneas reporteras sintéticas.
- Evaluar el efecto de citocininas exógenas sobre genes de la vía de señalización de citocininas de tomate y líneas reporteras a citocininas.
- Analizar la relación entre *SISPT* y la vía de señalización de citocininas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2. Material vegetal

Se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad Micro-Tom-Rg1, de la línea de degradación de citocininas 35S::CKX2 (líneas no publicadas de Lázaro E. P. Peres), y de las líneas marcadoras a citocininas: TCS::VENUS, ARR5::GUS, y a auxinas: DR5::VENUS (líneas no publicadas de Naomi Ori y Yuval Eshed). Las plantas se desarrollaron bajo condiciones de invernadero (28 °C y 16/8 h; luz/oscuridad), en una mezcla de sustrato compuesta por: tierra de hoja, perlita, tierra lama, arena (3:1:1:1).

4.3. Histología

Con objeto de determinar la morfología, botones y ovarios de tomate en etapas 5, 6, 9 y 10 (Xiao *et al.*, 2009) fueron fijados en FAE (3.7% formaldehído, 5% ácido acético glacial, 50% etanol absoluto), deshidratados en series de etanol 70, 85, 95 y 100%, y embebidos en Technovit (Technovit® 9100). Secciones de 10 µm fueron obtenidas en un micrótopo rotatorio (Leica®) y teñidas con azul alción 0.5% (pH 3.1 Sigma Aldrich) y rojo neutro.

Para el análisis de la línea ARR5::GUS, las inflorescencias de tomate fueron incubadas a 37°C con una solución de X-Gluc durante 39 h (Jefferson *et al.*, 1987). Pasado este tiempo, las muestras fueron deshidratadas y fijadas en FAE para su inclusión en Technovit y posterior análisis.

4.4. Microscopía óptica.

Las imágenes de ovarios teñidos con azul de alción y rojo neutro, y los ovarios de las inflorescencias de la línea ARR5::GUS, fueron obtenidas utilizando un microscopio óptico (Zeiss Axio Observer Z.1). Para el análisis de las líneas marcadoras a citocininas TCS::VENUS y a auxinas DR5::VENUS, imágenes de ovarios de tomate en etapas 3-10 (Xiao *et al.*, 2009) fueron capturadas utilizando un microscopio invertido de barrido láser confocal LSM 510 META. VENUS fue excitada usando un

láser de argón a 488 nm y el yoduro de propidio fue excitado a 514 nm. La emisión de *VENUS* fue filtrada usando el filtro BP 535-590 nm y la emisión del yoduro de propidio fue filtrada usando un filtro LP 575 nm.

4.5. Extracción de ácidos nucleicos

El DNA genómico fue extraído de hojas de tomate de acuerdo al método de SHORTY BUFFER (Edwards *et al.*, 1991). El RNA total de flores y frutos fue aislado utilizando el método de Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo al manual del reactivo. A partir del RNA total se sintetizó cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen®) de acuerdo al protocolo del fabricante.

4.6. Identificación de *SISPT* y reguladores de respuesta en tomate (*TRR*)

El gen *SISPT* fue identificado con base en análisis con “Blast” y filogenias reportadas para la familia bHLH en tomate (Sun *et al.*, 2015). Con este procedimiento se encontraron dos homólogos a *SPT*, los cuales fueron designados en este proyecto como *SISPT1* y *SISPT2*. Las secuencias de ambos genes fueron obtenidas del sitio web <http://solgenomics.net>. A partir de ellas se diseñaron oligonucleótidos iniciadores específicos para amplificar fragmentos de cada gen en la región 3’ (ANEXO 1).

Para el caso de los reguladores de respuesta a citocininas de tomate (*TRR*), los de tipo A (*TRR3/4* y *TRR16/17*) fueron reportados previamente (Shani *et al.*, 2010), y los de tipo B (*TRR1* y *TRR2*) fueron determinados con base en análisis con “Blast” (bidireccionales) para tratar de determinar los homólogos de los genes *ARR1* y *ARR2* de *Arabidopsis*. Las secuencias de los genes fueron obtenidas del sitio web <http://solgenomics.net>. y a partir de ellas se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores de ~200 a 300 pb (ANEXO 1).

4.7. Cuantificación de los niveles de expresión

Para determinar la expresión de *SISPT1* y *SISPT2* en diferentes etapas de desarrollo del fruto, se realizó RT-PCR semicuantitativa. Se analizaron botones florales (-12 a 0 dpa) en etapas de formación de ovario, previamente reportadas por Xiao *et al.*, (2009), y frutos de 2-45 dpa. Para el caso de los reguladores de respuesta *TRR1*,

TRR2, *TRR3/4* y *TRR16/17* se utilizó el cDNA obtenido del RNA de flores en antesis, 24 y 48 h después de la inducción con citocininas. Se analizaron también los niveles de expresión de *SISPT1* y *SISPT2* en flores en antesis en la línea de degradación de citocininas *35S::CKX2* y en plantas silvestres 48 h después de la inducción con citocininas. Asimismo, se analizaron los niveles de expresión en hojas de plantas transformadas con la construcción *35S::SISPT2-AS*. El gen *ACTINA 7* fue utilizado como control interno para normalizar la expresión. Los valores de expresión relativa de los *TRR* fueron calculados utilizando el programa Quantity One®.

4.8. Construcciones antisentido

Con objeto de determinar la función de los genes *SISPT1* y *SISPT2*, se trataron de generar líneas transgénicas estables; para ello se realizaron dos construcciones en antisentido; *35S::SISPT1-AS* y *35S::SISPT2-AS*, usando fragmentos de 338 y 369 pb, del extremo 3' incluida una parte de la región UTR de cada gen. Los fragmentos utilizados fueron amplificados por PCR utilizando como templado cDNA obtenido del RNA de flores de tomate en antesis. Los productos obtenidos fueron purificados con el PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen™) y clonados en orientación antisentido en el vector de entrada pENTR/D-TOPO.

Con la finalidad de reproducir el vector, se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* cepa DH5- α con el vector de entrada y se verificó si contenían el fragmento deseado mediante PCR de colonia.

Una vez verificado que el fragmento había sido clonado en el pENTR, se realizaron extracciones de DNA plasmidico utilizando el PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen™) de acuerdo al protocolo del fabricante. Cada una de las muestras se mandó secuenciar para verificar la fidelidad del fragmento clonado, y se digirió con la enzima *Apa I* para linearizar el plásmido.

Una vez verificado el contenido del fragmento de interés en el vector pENTR/D-TOPO se realizó una reacción de recombinación con el vector destino pGD625 (el cual contenía el promotor 35S) bajo el sistema de recombinación GATEWAY®. Con la reacción anterior se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* cepa DH5-

α para verificar el contenido del vector destino tal como se describió anteriormente. Una vez corroborado esto, se transformaron células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa GV2260.

Las construcciones antisentido fueron utilizadas para transformar explantes de tomate de la variedad MT-Rg1; ambas construcciones contenían el gen de resistencia a kanamicina, el cual sirvió como un marcador de selección durante el proceso de transformación.

4.9. Transformación genética de tomate

4.9.1. Obtención de plántulas y extracción de explantes de cotiledón

Semillas de tomate MT-Rg1 fueron esterilizadas por agitación durante 15 min, con una solución que contenía cloro comercial al 30% y dos gotitas de Tween 20, y luego lavadas con agua destilada estéril hasta eliminar la solución de cloro. Las semillas fueron germinadas en placas Petri de 10x30 cm de diámetro que contenían 30 mL de medio de germinación (ANEXO 2); alrededor de 20 semillas fueron colocadas por placa, se sellaron con parafilm e incubaron a 25°C +/- 1°C por 4 días en oscuridad, seguido de 4 días en fotoperíodo (16 h luz, 8 oscuridad) con ayuda de una lámpara fluorescente de 40 watts. Explantes de cotiledones de plántulas de 8 días de edad fueron obtenidos removiendo la parte distal y proximal.

4.9.2. Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación

El *Agrobacterium* transformado con cada una de las construcciones se plaqueó por estría en medio sólido LB adicionado con 50 mg L⁻¹ de rifampicina y 100 mg L⁻¹ de kanamicina y se incubó a 28 °C por 48 h. Transcurrido este período una de las colonias aisladas fue transferida a 3 mL de medio líquido LB suplementado con los antibióticos anteriores e incubado a 28 °C por 48 h a 120 rpm, del cultivo anterior fueron transferidos 500 µL a 50 mL de medio líquido LB adicionado con los antibióticos anteriores e incubado durante una noche a 28 °C a 120 rpm.

Para la inoculación de explantes, el cultivo anterior fue diluido 1:20 en medio MS líquido basal suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa ajustando a una D.O_{600 nm} de

0.2 a 0.3. Minutos antes de la inoculación se adicionó acetosiringona estéril (100 μM) a la suspensión bacterial.

4.9.3. Cultivo de explantes primarios y cocultivo

Los explantes obtenidos fueron inoculados por inmersión en la suspensión bacterial durante 20 min. Transcurrido este tiempo alrededor de 20 explantes fueron colocados en placas que contenían 25 mL de medio de inducción de raíz (RIM; ANEXO 2), las cuales fueron incubadas durante dos días a 28 °C en condiciones de oscuridad.

4.9.4. Inducción de organogénesis

Después del cocultivo con *Agrobacterium*, los explantes fueron transferidos a un medio de inducción de tallo (SIM; ANEXO 2) que contenía zeatina 10 μM como citocinina para inducir la organogénesis y generar brotes. Se colocaron 20 explantes por placa y se sellaron con parafilm para evitar su excesiva evaporación. Las placas fueron incubadas a 25 \pm 1 °C por 6-10 semanas bajo un fotoperíodo de 16 h luz. Para favorecer el desarrollo de estructuras organogénicas, a las 6-10 semanas de su cultivo los brotes fueron separados de los callos y se cultivaron en un medio con giberelinas (2 mg L⁻¹) durante 2 semanas.

4.9.5. Enraizamiento

Una vez que los brotes tenían un tallo bien definido (2 a 3 mm), éstos fueron transferidos a un medio libre de hormonas para inducir su enraizamiento. Las primeras raíces aparecieron aproximadamente a las 3 semanas, y 3 semanas después el sistema radicular estaba bien desarrollado.

4.9.6. Aclimatación a invernadero

Una vez que las plantas tenían raíces bien definidas, éstas fueron transferidas a tierra utilizando la mezcla descrita anteriormente, y llevadas a cámara de plantas durante 2 semanas y posteriormente a invernadero para que continuaran su desarrollo.

4.9.7. Selección de plantas transformadas

Con objeto de seleccionar las plantas transformadas se realizó PCR con oligonucleótidos del promotor 35S y *SISPT1* o *SISPT2* utilizando DNA extraído de cada una de las plantas obtenidas, para determinar la inserción de la construcción.

4.9.8. Comprobación del silenciamiento en plantas transformadas

Una vez seleccionadas las plantas que tenían la construcción, se procedió a hacer RT-PCR semicuantitativa para comprobar si el silenciamiento había funcionado. Se analizó la región del transcrito de cada gen para determinar si el nivel de expresión había disminuido.

4.9.9. Análisis fenotípicos

Las plantas que mostraron un menor nivel de expresión, fueron analizadas fenotípicamente. Se analizaron frutos de 20 dpa para determinar si había efectos en su desarrollo, se determinó el número de lóculos y de semillas.

4.10. Tratamientos hormonales

Con objeto de determinar la respuesta a citocininas exógenas, se realizaron aplicaciones con una solución que contenía bencilaminopurina 100 μ M (BAP; Duchefa Biochemie, <http://www.duchefa.com>) y Silwet 0.01% v/v (Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA) y como control se utilizó una solución que contenía NaOH 0.2 N y Silwet 0.01% v/v. Se analizó la respuesta transcripcional a citocininas en botones florales en la etapa 6 de la línea *TCS::VENUS*, 48 h después de la aplicación. En el caso de la línea *ARR5::GUS* las aplicaciones se realizaron cada 24 y 48 h, y 24 h después de cada aplicación las inflorescencias fueron colectadas y analizadas.

Para determinar el comportamiento de los *TRR*, *SISPT1* y *SISPT2* en respuesta a citocininas, se realizaron inducciones aplicando la solución descrita anteriormente sobre flores en anthesis de plantas silvestres. Las flores tratadas fueron colectadas 24 y 48 h posterior a la aplicación para analizar los niveles de expresión de cada gen.

5. RESULTADOS

5.2. Identificación del ortólogo de *SPT* en tomate

Como primer paso para el desarrollo de este proyecto, se identificó el posible ortólogo de *SPT* en tomate. Previamente se había reportado la familia de factores de transcripción de tipo bHLH en tomate (Sun *et al.*, 2015). Con base en ello se seleccionaron dos homólogos muy cercanos a *SPT* (*AtbHLH024*), *SlbHLH017* (*Solyc02g093280*) y *SlbHLH035* (*Solyc04g078690*) (Figura 7). Con las secuencias de aminoácidos de cada gen se realizaron “Blast” contra *SPT*, y se encontró un alto porcentaje de homología entre *SlbHLH017* y *SPT* (83.66%) y entre *SlbHLH035* y *SPT* (80.40%), los cuales fueron nombrados como *SISPT1* y *SISPT2*, respectivamente. Sin embargo, en la filogenia, muy cerca de ellos, se encontró *ALC* (*AtbHLH073*; Figura 7), el cual mantiene una función redundante con *SPT* durante el desarrollo del fruto de *Arabidopsis* (Groszmann *et al.*, 2011). Análisis con las secuencias proteicas en “Blast” mostraron 82.84% de homología entre *ALC* y *SISPT1*, y 77.67% entre *ALC* y *SISPT2*. Estos resultados nos sugieren que ambos genes son más parecidos a *SPT* que a *ALC*, razón por la cual se decidió trabajar con ambos genes.

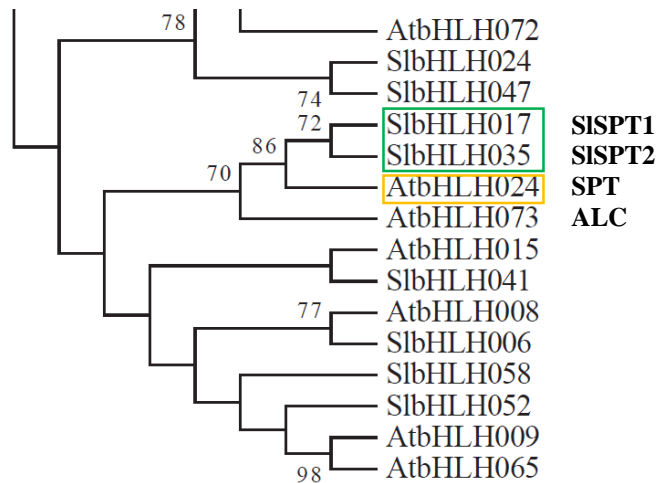


Figura 7. Árbol filogenético basado en los dominios bHLH de las proteínas *AtbHLHs* (*Arabidopsis*) y *SlbHLHs* (tomate). Los posibles ortólogos *SISPT1* y *SISPT2* son indicados en el recuadro verde. En el recuadro naranja se muestra a *SPT* (Sun *et al.*, 2015).

Con las secuencias de aminoácidos de los posibles ortólogos, se determinó la similitud en la región conservada, la cual está asociada con la función del gen (Groszmann *et al.*, 2008). Esta región está compuesta por una región básica que está encargada de dar especificidad a los sitios de unión al DNA, la región HLH que es asociada a la homo y heterodimerización, una secuencia bipartita (NLS) con dominio de localización nuclear y una cadena beta adyacente al dominio bHLH (Figura 8). Esta región conservada consta de 62 aminoácidos, de los cuales 60 están presentes en SISPT1, mientras que SISPT2 conserva 56. Adicionalmente se determinó la región bHLH en ALC, el cual conserva 51/62 aminoácidos.

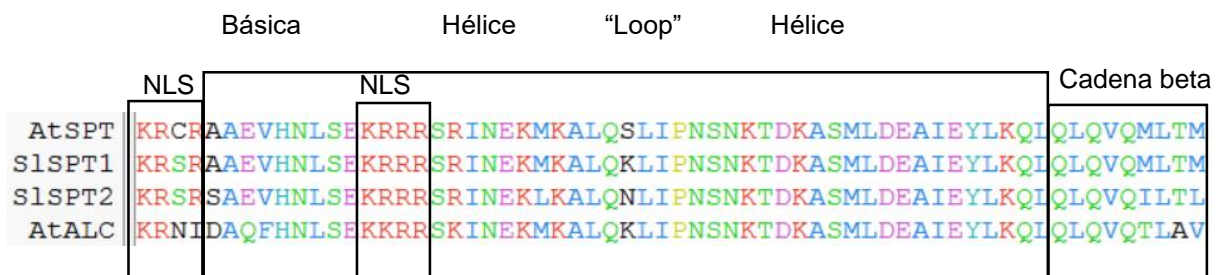


Figura 8. Alineamiento de las regiones conservadas de la proteína SPT y sus posibles ortólogos en tomate SISPT1 y SISPT2. El dominio conservado en los ortólogos fue identificado utilizando una secuencia de 62 aminoácidos conservados. Esta región incluye un dominio bipartito NLS, la región bHLH y una cadena beta en el C-terminal.

5.3. Patrones de expresión de *SISPT1* y *SISPT2* durante el desarrollo del fruto de tomate

Una vez identificados los posibles ortólogos de *SPT* se procedió a analizar en más detalle su expresión durante el desarrollo del fruto. Primero se verificó que ambos genes tuvieran expresión durante el desarrollo del fruto con ayuda de la página web: http://bar.utoronto.ca/ef_ptomato/cgi-bin/efpWeb.cgi. Una vez verificado esto, se analizaron los niveles de expresión durante diferentes etapas de desarrollo de fruto, las cuales incluyeron formación de ovario y desarrollo de frutos posterior a la antesis (Figura 9). Ambos genes mostraron una expresión diferencial a lo largo del desarrollo del fruto. Sin embargo, *SISPT1* mostró expresión de los -12 a 0 dpa y durante los primeros 30 días posteriores a la antesis hasta que el fruto alcanzó su tamaño final,

teniendo máximos niveles de expresión en etapas de formación del ovario (-12 y -11 dpa), 0 y 10 dpa. *SISPT2* fue expresado durante todas las etapas de desarrollo analizadas, presentando mayores niveles de expresión en -12, -2, 0 y 2 dpa. La expresión de ambos genes en etapas análogas de desarrollo en las que *SPT* muestra expresión (-12, -11, 0 y 30 dpa) nos permite sugerir que en tomate ambos genes podrían actuar de manera redundante en la formación del ovario y durante el crecimiento del fruto.

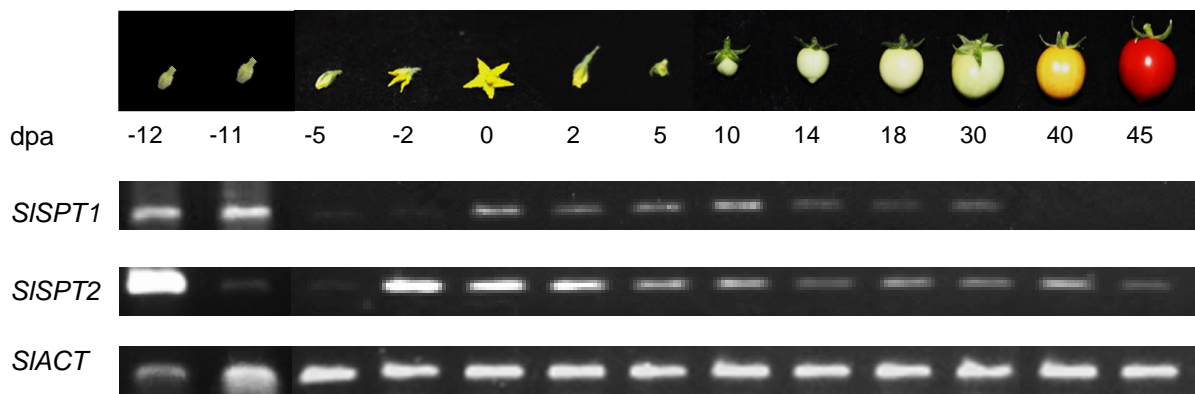


Figura 9. Patrones de expresión de *SISPT1* y *SISPT2* a lo largo del desarrollo del fruto de tomate. -12 a 0 dpa corresponden a etapas de formación de ovario, 2-45 dpa desarrollo de fruto. dpa: días posteriores a la antesis. *SISPT1* muestra expresión en etapas previas a antesis (formación de ovario) y en frutos hasta 30 dpa que coincide con el tamaño final del fruto. *SISPT2* muestra expresión durante todas las etapas analizadas, incluyendo: formación de ovario, crecimiento y maduración de fruto.

Se ha demostrado que durante el desarrollo del carpelo y los márgenes de las valvas del fruto de *Arabidopsis* *SPT* actúa de manera redundante con *ALC* (Groszmann *et al.*, 2011). Dado que *SISPT1* y *SISPT2* mostraron alta homología también con *ALC*, se comparó el patrón de expresión de ambos genes con etapas análogas donde *ALC* muestra expresión (-12,-11,-2, 2, 5 y 30-45 dpa), y se observó que *SISPT2* mantiene un patrón de expresión más similar a *ALC* que a *SPT*, sugiriéndonos que probablemente *SISPT2* podría ser ortólogo a *ALC*, y no a *SPT*, y que al igual que *ALC* en *Arabidopsis*, en tomate *SISPT2* podría actuar de manera redundante con *SISPT1*

en el desarrollo de ovario y fruto donde podría desempeñar un papel importante durante la maduración.

5.4. Construcciones antisentido

Para investigar la función de *SISPT1* y *SISPT2* en tomate, se intentaron producir líneas transgénicas estables, en las cuales *SISPT1* o *SISPT2* fueron silenciados, específicamente. Para lograr esto se generaron dos construcciones en antisentido *35S::SISPT1-AS* y *35S::SISPT2-AS*, utilizando fragmentos de 338 y 369 pb, respectivamente. Los fragmentos fueron amplificados de la región 3' incluyendo una parte de la región 3' no traducida (UTR) de cada gen y clonados en orientación antisentido bajo el promotor 35S (Figura 10). Las construcciones obtenidas fueron utilizadas para transformar tomate de la variedad MT-Rg1. Ambas construcciones contenían el gen de resistencia a kanamicina, el cual sirvió como un marcador de selección durante el proceso de transformación.

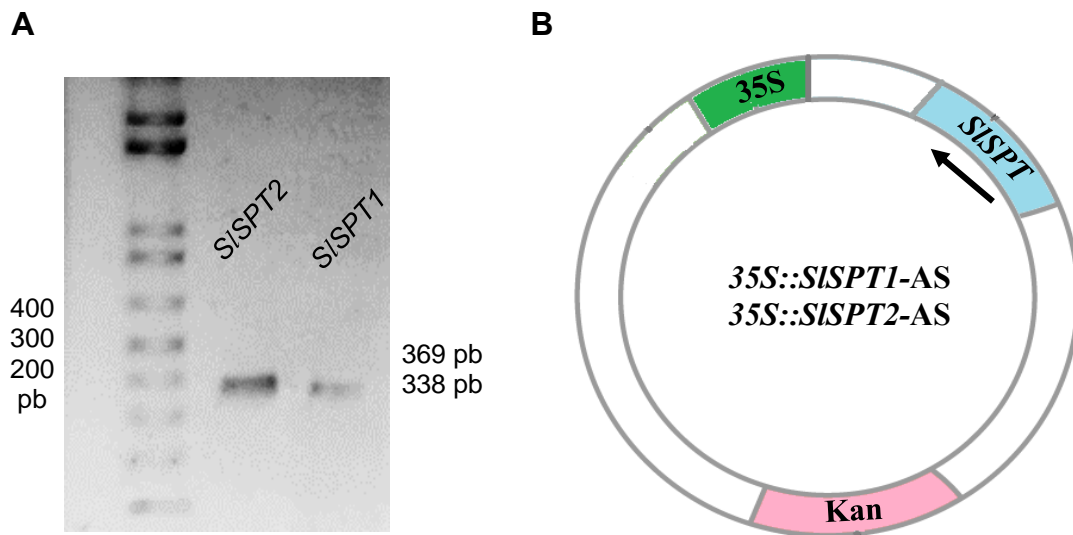


Figura 10. Diseño de construcciones en antisentido. A) Fragmentos amplificados de cada gen utilizados para las construcciones. B) Dibujo representativo de las construcciones en antisentido, ambas construcciones tienen resistencia a kanamicina.

5.5. Transformación genética de tomate

Con las construcciones en antisentido generadas, se intentaron producir líneas transgénicas estables por transformación con *Agrobacterium* en tomate de la variedad MT-Rg1. Se lograron regenerar plantas de tomate a partir de explantes de cotiledones para ambas construcciones (Tabla 1, Figura 11). Sin embargo, solamente plantas transformadas con la construcción 35S::*SISPT2*-AS, fueron transgénicas. Esto fue corroborado mediante PCR utilizando como templado DNA obtenido de hojas de plantas 35S::*SISPT2*-AS y oligonucleótidos para el promotor 35S y *SISPT2* lo que nos permitió verificar la inserción de la construcción (Figura 11 C).

Tabla 1. Número de plantas de tomate regeneradas y transformadas obtenidas para cada gen. las plantas transformadas T₀ se confirmaron mediante PCR

Gen	Brotos regenerados	Plantas regeneradas	Plantas transformadas (T ₀)
<i>SISPT1</i>	76	7	0
<i>SISPT2</i>	83	9	3
Controles	35	4	-

Para la transformación, se partió de 400 explantes de cotiledones para cada una de las construcciones, de ellos 300 fueron infectados con *Agrobacterium* y 100 sin infectar (control). De los explantes infectados cerca del 30% lograron regenerar brotes en el medio de cultivo con zeatina 10 µM y kanamicina 25 mg L⁻¹; de los brotes regenerados, solo cerca del 10% continuaron su desarrollo hasta planta completa en condiciones de invernadero.

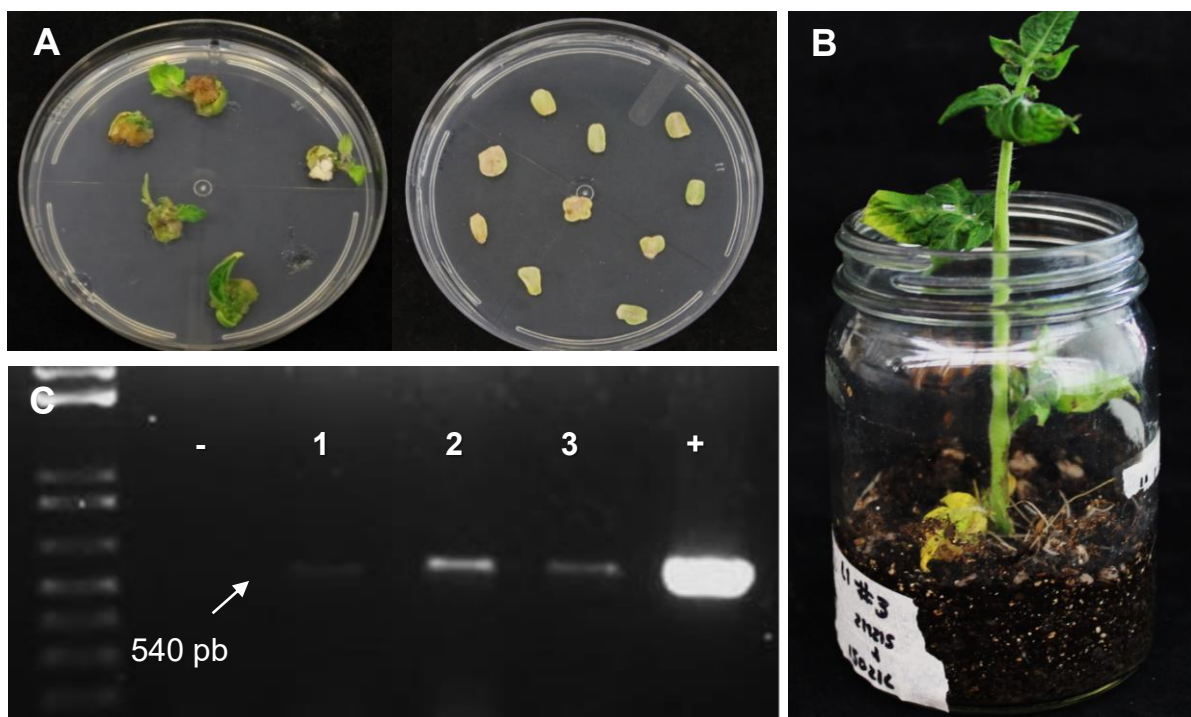


Figura 11. Líneas transgénicas de tomate MT-Rg1. A) Regeneración *in vitro* de explantes transformados (izquierda) y sin transformar (derecha) en presencia de kanamicina (25 mg L^{-1}). B) Fenotipo de una planta transgénica transformada con la construcción $35\text{S}::\text{SISPT2-AS}$. C) Confirmación de la inserción de la construcción $35\text{S}::\text{SISPT2-AS}$ en plantas transgénicas T_0 .

5.5.1. Confirmación del silenciamiento en plantas transformadas

Una vez determinado que las plantas tenían la construcción, se procedió a comprobar si el silenciamiento había funcionado. Para ello se realizó RT-PCR semicuantitativa utilizando cDNA obtenido de RNA de hojas de las plantas transformadas con $35\text{S}::\text{SISPT2-AS}$ para revisar el nivel de expresión del gen *SISPT2*. Se observó que las plantas transformadas mostraron una ligera disminución en el nivel de transcrito, comparadas con el control (Figura 12), sugiriéndonos que el silenciamiento inducido por la construcción $35\text{S}::\text{SISPT2-AS}$ había funcionado.

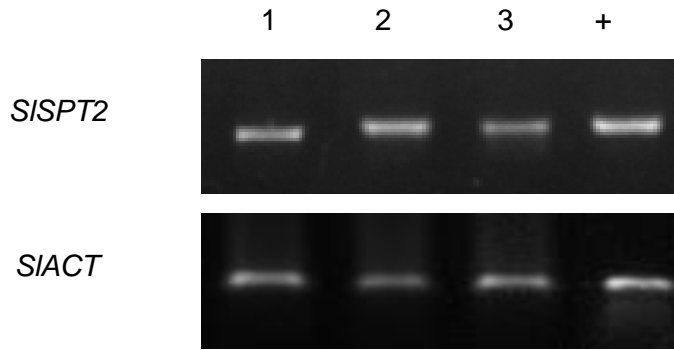


Figura 12. Análisis de expresión mediante RT-PCR de plantas de tomate transformadas con la construcción antisentido *35S::SISPT2-AS*. Las muestras fueron tomadas de tres plantas diferentes. En la imagen, los números indican la planta de la cual proviene la muestra para el análisis. Control (+), silvestre.

5.5.2. Análisis fenotípicos de plantas transformadas de tomate

Con objeto de determinar si había un efecto en el desarrollo del fruto en las plantas transformadas con *35S::SISPT2-AS*, se analizó la morfología de los frutos. En secciones transversales de frutos de 20 dpa de las tres líneas obtenidas, se observaron diferentes fenotipos que mostraron una reducción en el tejido locular que rodea a la placenta, un reducido número de semillas y un aumento en el número de lóculos comparado con el control (Tabla 2, Figura 13). Sin embargo, los fenotipos observados no fueron consistentes en las tres líneas analizadas, por lo que es necesaria la generación de más plantas transformadas para corroborar estos fenotipos.

Tabla 2. Número de semillas y lóculos en secciones transversales de frutos 20 dpa de tres líneas diferentes 35S::SISPT2-AS y plantas silvestres. Se muestran los promedios \pm la desviación estándar. n=2 réplicas biológicas de cada una de las plantas transformadas, n=5 réplicas biológicas de plantas control. DE. Desviación estándar.

Planta	Número de semillas	DE (\pm)	Número de lóculos	DE (\pm)	Semillas/Lóculo	DE (\pm)
1	15.5	0.7	3.5	0.7	4.5	0.7
2	16.5	0.7	5.0	0	3.3	0.1
3	15.5	0.7	3.0	0	5.2	0.2
Control	16.8	1.3	2.8	0.4	6.2	1.6



Figura 13. Fenotipos observados en frutos de 20 dpa de plantas de tomate transformadas con 35S::SISPT2-AS. Se observó una disminución en el tejido locular, número de semillas y un mayor número de lóculos comparado con el control. n=2 réplicas biológicas de cada una de las plantas transformadas. Barra de escala=20 mm.

5.6. Morfología del ovario de tomate

Con objeto de analizar la estructura del ovario de tomate y tejidos análogos donde se expresa *SPT*, se realizaron cortes transversales de ovarios y estilos en antesis de plantas silvestres MT-Rg1 (Figura 14). El ovario de tomate está compuesto por un septum y una columna central que forma cavidades locales, y por la placenta donde los óvulos se desarrollan. En *Arabidopsis*, *SPT* es responsable de generar el tracto de transmisión (Heisler *et al.*, 2001). En tomate este tejido es localizado en la región media del estilo.

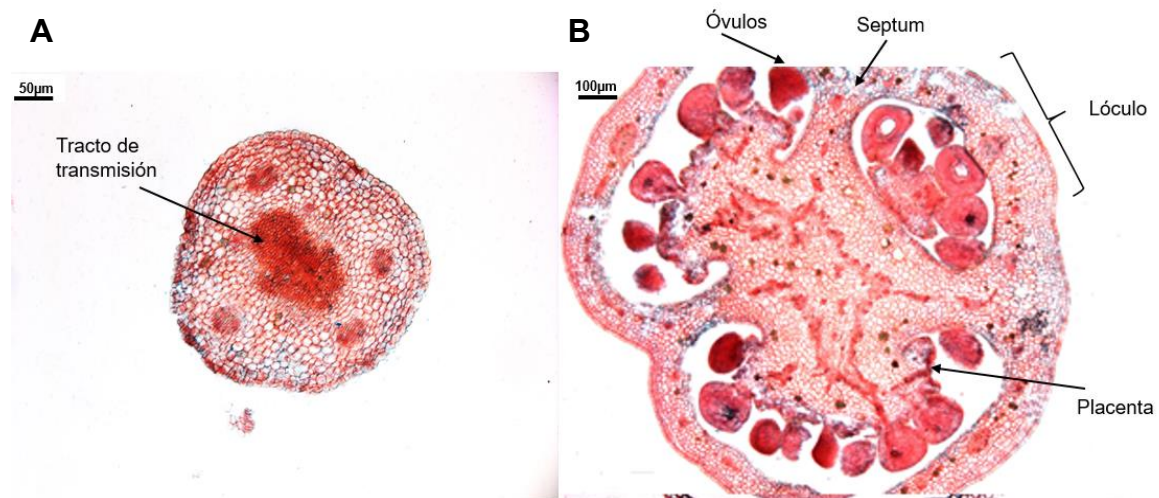


Figura 14. Morfología del ovario de tomate de una planta silvestre en antesis. Corte transversal del estilo, se puede apreciar un conjunto de células más compactas y teñidas de un rojo intenso en la región media que corresponden al tracto de transmisión. B) Corte transversal del ovario, se pueden apreciar la placenta, óvulos, lóculos y septum.

5.7. Patrón de fluorescencia de la línea reportera a citocininas *TCS::VENUS*

Para investigar la función de las citocininas durante el desarrollo temprano del fruto de tomate, se visualizó la señalización de citocininas en diferentes etapas de desarrollo de ovario, empleando la línea reportera sintética *TCS::VENUS* (two-component output sensor) (Línea no publicada de Naomi Ori y Yuval Eshed). *TCS* es un conjunto de fragmentos repetidos de motivos de unión a DNA de los

reguladores de respuesta de tipo B de la vía de señalización de citocininas y nos permite visualizar la respuesta transcripcional a esta hormona (Muller y Sheen, 2008).

Durante el desarrollo de la flor, el ovario, a partir del cual se desarrolla el fruto, comienza a formarse en el centro como un hueco que crece hasta fusionarse en la parte apical para dar origen al estilo. En las primeras etapas de desarrollo de la flor durante la formación de sépalos y pétalos, la señal de fluorescencia fue observada en ambos órganos (Figura 15 A), y a medida que avanzó su desarrollo la señal desapareció (Figura 15 B). En etapas posteriores, durante el desarrollo de los estambres y el ovario, la señal de fluorescencia fue detectada en los sacos polínicos de las anteras y en la placenta (Figura 15 C y D), y a medida que avanzó el desarrollo del ovario, la señal en la placenta comenzó a ser dirigida hacia los óvulos, los cuales derivan de ella (Figura 15 E). En las siguientes etapas la señal fue observada en óvulos y en los integumentos de éstos (Figura 15 F y G) donde disminuyó drásticamente cuando el desarrollo del ovario culminó (Figura 15 H).

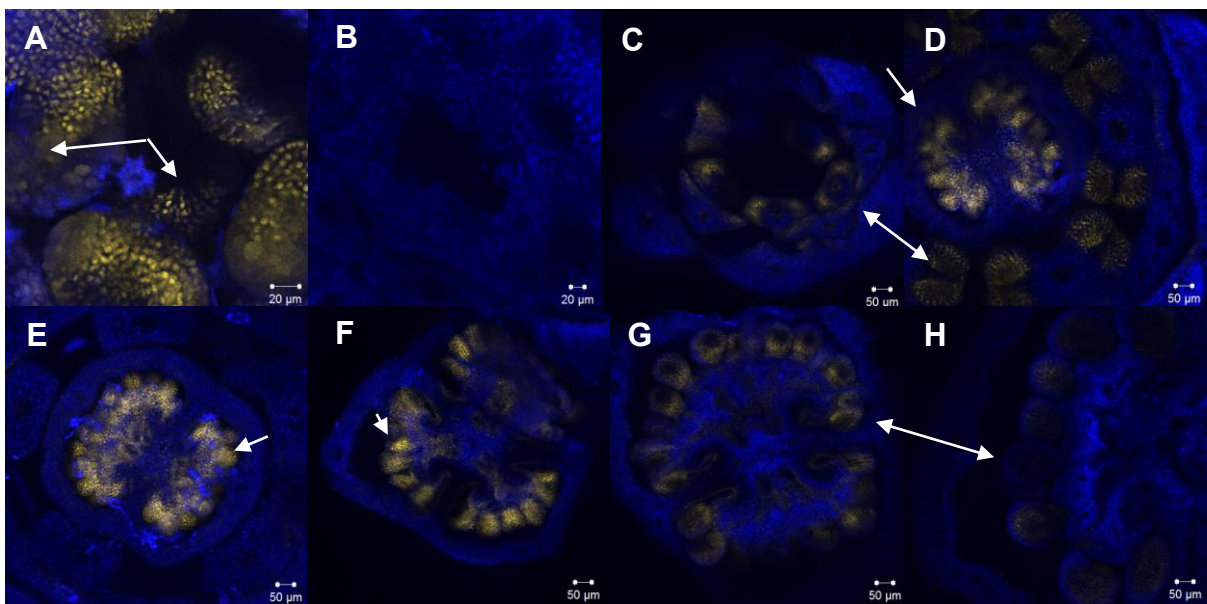


Figura 15. Patrón de fluorescencia de la línea reportera a citocininas *TCS::VENUS* en cortes transversales de botones florales y ovarios de tomate. La señal de fluorescencia es observada durante la formación de pétalos y sépalos (A), sacos polínicos de las anteras (C, D), placenta (D, E) y óvulos (F, G, H).

Con objeto de determinar si la respuesta transcripcional a citocininas era afectada por la aplicación exógena de éstas, se analizó el patrón de fluorescencia en secciones transversales de ovarios de la línea *TCS::VENUS*, 48 h después de la aplicación de una solución que contenía BAP 100 μ M o una solución “mock” (control). Se observó que ovarios tratados con BAP 48 h después de la aplicación, mostraron mayor intensidad en la señal de fluorescencia en tejidos de placenta en comparación con aquellos ovarios tratados con solución “mock” (control) (Figura 16).

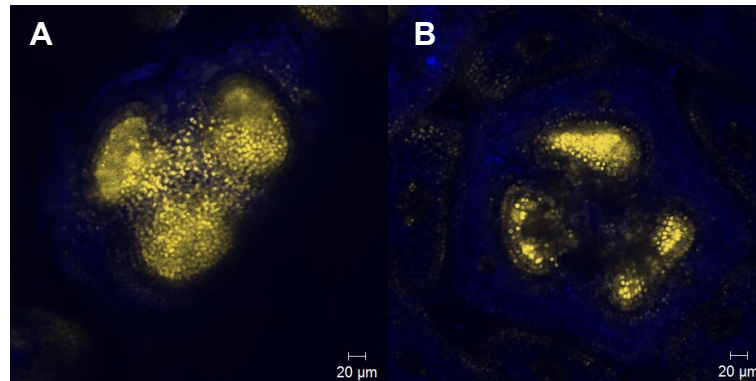


Figura 16. Señal de fluorescencia en secciones transversales de ovarios de tomate de la línea *TCS::VENUS* durante el desarrollo de placenta 48 h después de la aplicación exógena de citocininas con BAP 100 μ M. A) Señal de fluorescencia en placenta 48 h después de la aplicación de BAP 100 μ M. B) Señal de fluorescencia en placenta de un ovario tratado con solución “mock” (control). n=2 réplicas biológicas.

5.8. Patrón de expresión de la línea reportera sintética *ARR5::GUS*

De manera complementaria a lo expuesto anteriormente, para determinar la función de las citocininas y la respuesta a la aplicación exógena de éstas. Se analizó el patrón de expresión de la línea reportera sintética *ARR5::GUS* durante el desarrollo de ovario y estambres en flores de tomate. La línea *ARR5::GUS* contiene el promotor de un regulador de respuesta de tipo A de la vía de señalización de citocininas (*ARR5*) de *Arabidopsis* y de manera similar a *TCS*, nos permite visualizar la señalización y respuesta a esta hormona.

Se analizó la expresión de *ARR5::GUS* en secciones transversales de ovarios y anteras 48 h después de la aplicación de citocininas exógenas con una solución que contenía BAP 100 μ M, o una solución “mock” (control, NaOH 0.2 N). Mayor expresión de *ARR5::GUS* fue observada en ovarios y anteras tratados con BAP (Figura 17 A, B) respecto a ovarios y anteras tratados con solución “mock” (Figura 17 C, D).

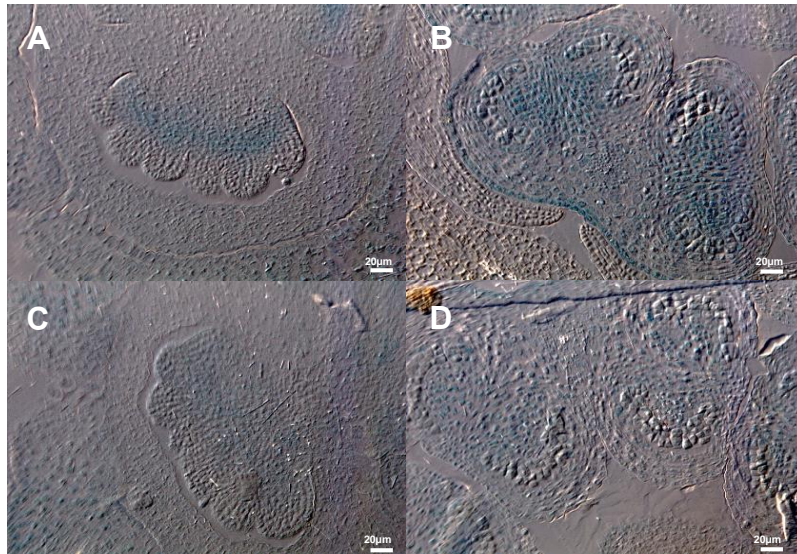


Figura 17. Patrón de expresión en secciones transversales de ovarios y anteras de botones florales de tomate de la línea *ARR5::GUS* en respuesta a la aplicación de citocininas exógenas. A) Expresión de *ARR5::GUS* en placenta y B) anteras 48 h después de la aplicación de BAP 100 μ M. C) Expresión de *ARR5::GUS* en placenta y D) anteras tratadas con una solución “mock” (control). n=2 réplicas biológicas.

5.9. Comparación del patrón de señalización de citocininas y auxinas durante el desarrollo temprano del fruto de tomate

Citocininas y auxinas, juntas regulan muchos procesos de desarrollo en plantas. Durante el desarrollo del fruto de tomate ambas hormonas son necesarias para procesos de fructificación y de división celular (Gillaspy *et al.*, 1993). Con objeto de visualizar la relación entre estas hormonas en contexto de desarrollo temprano del

fruto de tomate, el patrón de fluorescencia de la línea reportera a auxinas *DR5::VENUS* fue observado y comparado con el patrón de fluorescencia de *TCS::VENUS*, en diferentes etapas de desarrollo de flor (Figura 18). Las etapas fueron determinadas de acuerdo a Xiao *et al.*, (2009). En etapa 5 la señal de fluorescencia de *TCS::VENUS* fue detectada en los sacos polínicos de las anteras mientras que *DR5::VENUS* fue observada en los filamentos de las anteras y en la región donde se fusionaran los carpelos para dar inicio a la formación del estilo (Figura 18 A, E). En etapa 6, la señal de *TCS::VENUS* aún es presente en anteras y es detectada también a lo largo de la placenta, para el caso de *DR5::VENUS*, es focalizada en la región exterior de la placenta, donde se comienzan a desarrollar los óvulos (Figura 18 B, F). En etapa 9 la señal de ambas líneas es observada en óvulos, donde *TCS::VENUS* es presente en los integumentos que rodean al saco embrionario donde *DR5::VENUS* es detectada (Figura 18 C,G). En etapa 10, la cual corresponde a antesis, la señal de fluorescencia de ambas líneas disminuye drásticamente, perdiéndose por completo en *DR5::VENUS* (Figura 18 D,H). La señal de ambas líneas durante las diferentes etapas analizadas fue específica a un tejido, sin embargo, en el desarrollo de óvulo en etapa 9, la señal de fluorescencia de ambas líneas es detectada, lo cual nos sugiere un papel complementario durante el desarrollo de este tejido.

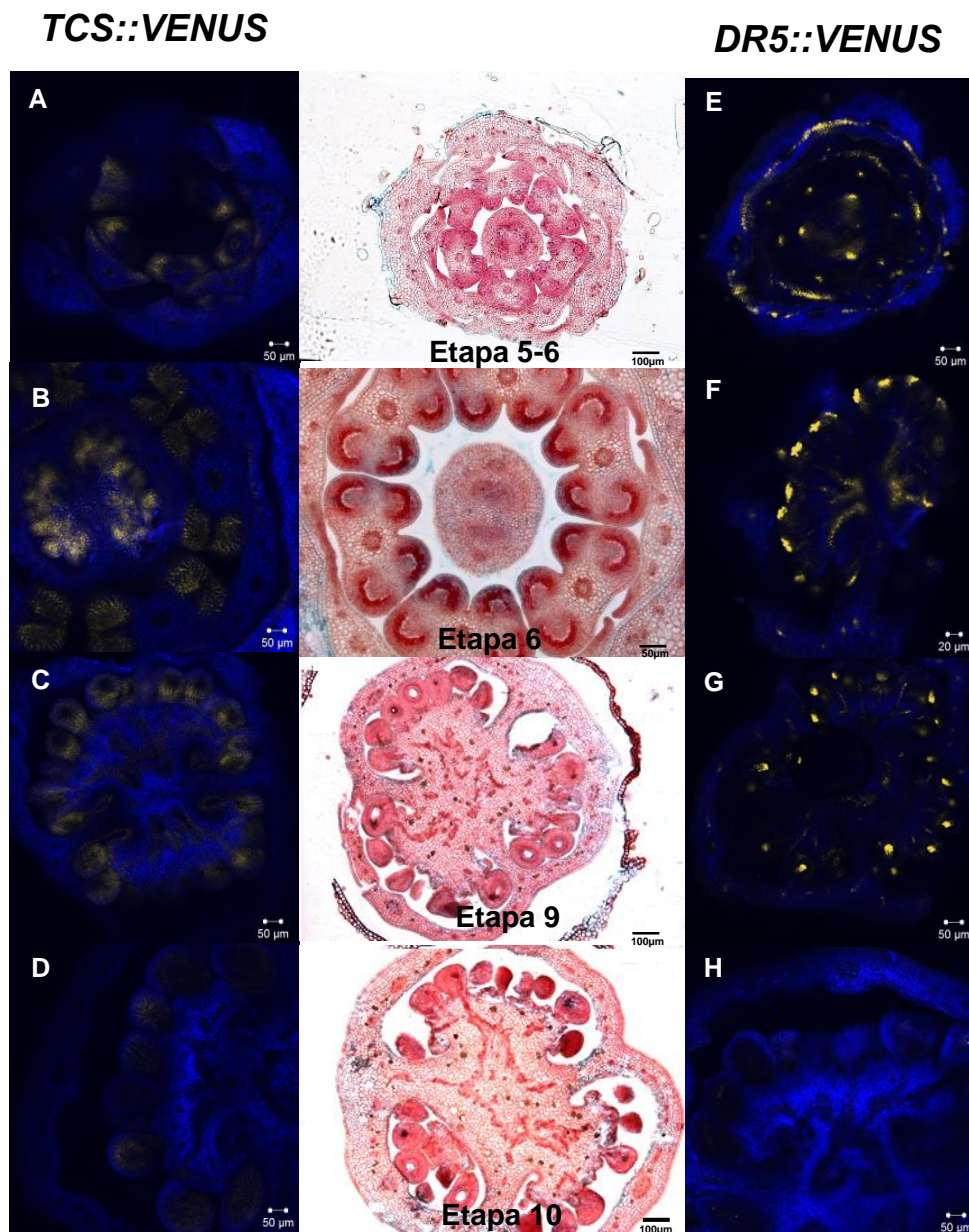


Figura 18. Comparación de los patrones de fluorescencia en secciones transversales de botones florales y ovarios de tomate de las líneas marcadoras de señalización a citocininas *TCS::VENUS* y auxinas *DR5::VENUS*. Las etapas de desarrollo fueron determinadas de acuerdo a Xiao *et al.*, (2009) y son indicadas en las imágenes del centro. A-D) Señal de fluorescencia de *TCS::VENUS* en anteras y ovarios. E-H) Señal de fluorescencia de *DR5::VENUS* en anteras y ovarios.

5.10. Relación de los genes *SISPT1*, *SISPT2* y las citocininas

Una vez determinado que las citocininas podrían desempeñar un papel durante el desarrollo temprano del fruto de tomate, y que *SISPT* se expresaba durante el mismo período, se trató de determinar si el modelo de regulación de *SPT* y la vía de señalización de citocininas sugerido en *Arabidopsis*, se conservaba en tomate. Para ello se analizó el comportamiento de los reguladores de respuesta de la vía de señalización de citocininas en tomate (*TRR*), *SISPT1* y *SISPT2*, en respuesta a cambios en los niveles de citocininas.

Para analizar el comportamiento de los Reguladores de Respuesta de la vía de señalización de citocininas de tomate (*TRR*) en respuesta a citocininas, se realizó la aplicación de citocininas exógenas con una solución que contenía BAP 100 μ M o una solución “mock” como control, en flores en anthesis, y se cuantificó la expresión 24 y 48 h después de la aplicación (Figura 19 y 20, respectivamente).

En el caso de los reguladores de respuesta de tipo B, *TRR1* y *TRR2*, no se observó un cambio significativo en el nivel de expresión, respecto al control 24 y 48 h después de la aplicación (Figura 19 y 20), lo cual concuerda con lo previamente reportado en *Arabidopsis*, donde la expresión de los RR tipo B en respuesta a citocininas exógenas no se ve alterada, mientras que los TRR tipo A, *TRR3/4* y *TRR16/17*, mostraron cambios en sus niveles de expresión a las 24 y 48 h después de la aplicación (Figura 19 y 20). Sin embargo, solamente el *TRR 16/17* mostró un aumento significativo en su nivel de expresión, con un comportamiento similar a los RR A de *Arabidopsis*, los cuales son fácilmente inducibles por citocininas a tiempos cortos (D'Agostino *et al.*, 2000). Estos resultados nos sugieren que la respuesta en ambos tipos de RR se conserva en ambas especies.

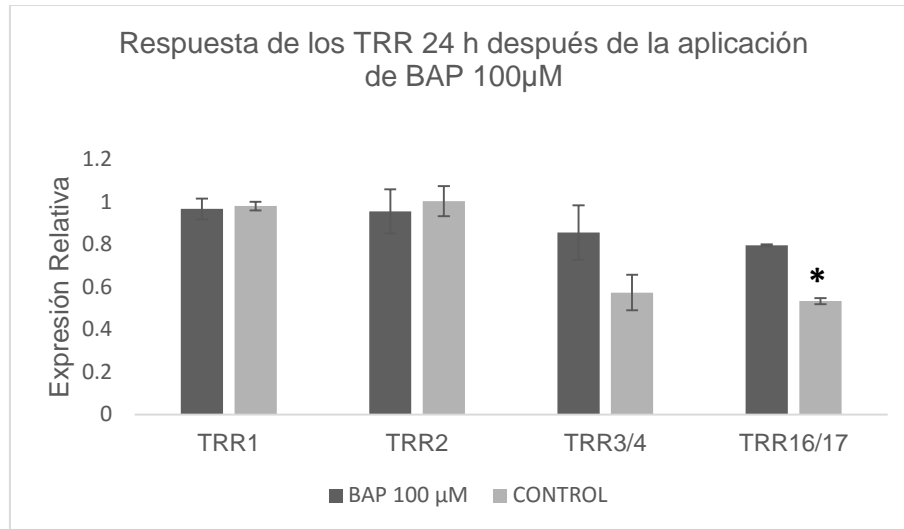


Figura 19. Cuantificación de la expresión relativa por RT-PCR de los *TRR* en flores de tomate en antesis 24 h después de la aplicación de BAP 100 μM. Se muestran los promedios ± la desviación estándar (n=2 réplicas biológicas). * Significativamente diferente respecto a su control (plantas tratadas con solución “mock” NaOH 0.2 N). P=0.05.

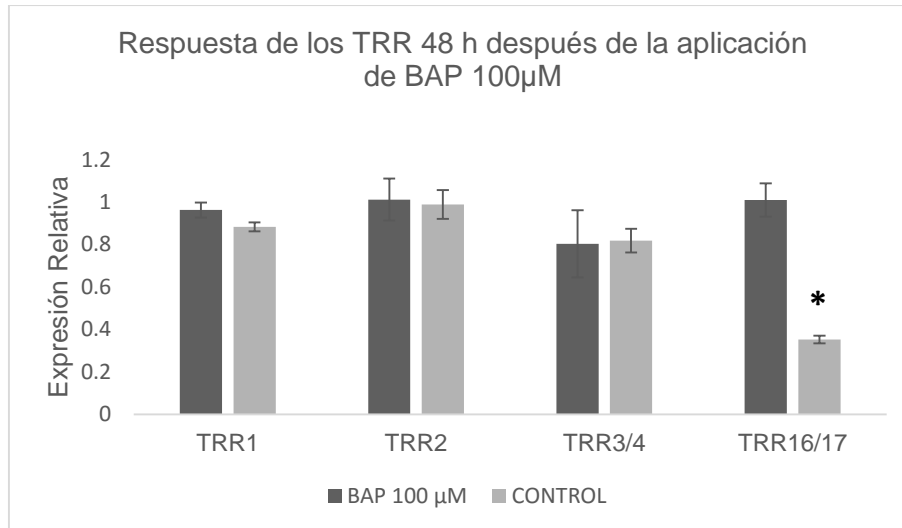


Figura 20. Cuantificación de la expresión relativa por RT-PCR de los *TRR* en flores de tomate en antesis 48 h después de la aplicación de BAP 100 μM. Se muestran los promedios ± la desviación estándar (n=2 réplicas biológicas). * Significativamente diferente respecto a su control (plantas tratadas con solución “mock” NaOH 0.2 N). P=0.05.

Para determinar el comportamiento de *SISPT1* y *SISPT2* en respuesta a citocininas, se analizó la expresión de ambos genes en flores en anthesis en la línea de degradación de citocininas *35S::CKX2* y en flores en anthesis de plantas silvestres 48 h después de la aplicación de citocininas exógenas con BAP 100 μ M.

Cambios en los niveles endógenos de las citocininas no afectaron la expresión de *SISPT1* y *SISPT2*; esto fue evidente al analizar la expresión de ambos genes en la línea de degradación de citocininas donde no se observó un cambio en la expresión respecto al control (Figura 21 A). De manera similar, la expresión de ambos genes en respuesta a un incremento en los niveles exógenos de citocininas no se vio alterada (Figura 21 B). No obstante, resultados de un análisis de predicción de los motivos de unión a citocininas indicaron la existencia de estos motivos en los promotores de *SISPT1* y *SISPT2* (ANEXO 4). Sin embargo, el comportamiento que presentó *SISPT1* y *SISPT2* no fue similar al de *SPT*, indicando que el modelo de regulación con la vía de señalización de citocininas tal vez no se encuentre conservado.

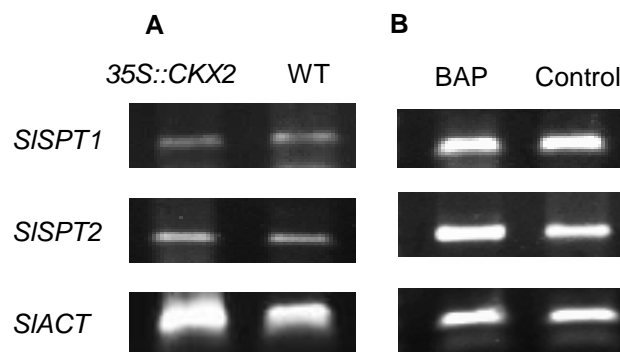


Figura 21. Análisis de expresión de *SISPT1* y *SISPT2* en respuesta a los niveles endógenos y exógenos de citocininas. A) No se observa un cambio en la expresión de ambos genes en respuesta a una disminución de los niveles endógenos de citocininas. B) Los niveles de expresión de ambos genes no se ve alterada por la aplicación de citocininas exógenas.

6. DISCUSIÓN

El desarrollo del fruto es un proceso altamente coordinado y regulado por mecanismos complejos que involucran la interacción entre genes y hormonas (Seymour *et al.*, 2013). La conservación de la función de genes entre diferentes especies ha sido investigada por el estudio de genes ortólogos.

Durante este trabajo se trató de dilucidar la función de *SISPT* durante el desarrollo del fruto de tomate. *SISPT* es un ortólogo de *SPT* de *Arabidopsis*, el cual es responsable de la formación de tejidos del gineceo en etapas tempranas de desarrollo del fruto (Heisler *et al.*, 2001). Con base en datos reportados y análisis con “Blast” se determinaron dos posibles ortólogos a *SPT* en tomate: *SISPT1* y *SISPT2*, los cuales mostraron 83 y 80%, de homología con *SPT*, respectivamente.

Durante el desarrollo del fruto de *Arabidopsis* *SPT* actúa de manera redundante con *ALC*, un miembro de la familia bHLH (Groszmann *et al.*, 2011). Análisis de homología en la región conservada de las proteínas *SPT*, *ALC*, *SISPT1* y *SISPT2*, indicaron un alto porcentaje de conservación entre *SPT* y sus posibles ortólogos (Figura 8). Trabajos previos han reportado dos dominios adicionales al bHLH en la proteína *SPT*, una hélice anfipática y un residuo ácido, éste último esencial para la función de *SPT* en el gineceo (Groszmann *et al.*, 2008). La hélice anfipática, pero no el residuo ácido es conservada en *ALC* (Groszmann *et al.*, 2011). En *SISPT1* la hélice anfipática y el residuo ácido han sido reportados previamente (Groszmann *et al.*, 2008), no así para *SISPT2*, sugiriéndonos que *SISPT2* podría no ser ortólogo de *SPT*, a pesar del alto porcentaje de homología.

La expresión de *SISPT1* y *SISPT2* en etapas análogas de desarrollo en las que *SPT* o *ALC* son expresados, sugiere que ambos genes podrían actuar de manera redundante durante el desarrollo del ovario y fruto de tomate (Figura 9). Sin embargo, el patrón de expresión de *SISPT2* parece ser más similar a *ALC* que a *SPT*, sugiriéndonos que *SISPT2* podría ser ortólogo de *ALC*, y que de manera similar a *ALC* en *Arabidopsis*, en tomate *SISPT2* podría actuar de manera redundante con

SISPT1 durante el desarrollo del ovario y fruto, y desempeñar un papel importante durante la maduración.

La duplicación de *SPT* y *ALC* ocurrió durante un evento de duplicación del genoma entero en el linaje de las brassicáceas (Groszmann *et al.*, 2011). Sin embargo, la duplicación en las dicotiledóneas que ha llevado a la evolución de linajes específicos de *SPT* y *ALC* también ha sido identificada (Pabón-Mora *et al.*, 2013), indicando que la presencia de ambos genes con funciones redundantes en dicotiledóneas como el tomate, puede ocurrir.

Aunque hay muy pocos análisis funcionales de *SPT* o *ALC* en especies diferentes a *Arabidopsis*, estudios previos en durazno (*Prunus pérsica*) indicaron un papel del ortólogo de *SPT* en durazno (*PPERST*) en el desarrollo del fruto (Tani *et al.*, 2011). Ellos observaron expresión de *PPERST* en ovario y márgenes del endocarpo, donde la co-expresión con *PPERFUL* y *PPERSTP*, ortólogos de *FUL* y *SHP*, indicó un papel similar al de *ALC* en *Arabidopsis*. De manera similar el ortólogo de *SPT* en fresa (*FaST*) mostró una expresión importante en receptáculos, sugiriendo un papel importante durante el desarrollo del fruto (Tisza *et al.*, 2010).

La función de *SISPT1* y *SISPT2* trató de ser dilucidada a través de la generación de líneas transgénicas estables, donde *SISPT1* o *SISPT2* fueron silenciados específicamente. Sin embargo, la eficiencia en la regeneración de plantas transformadas de tomate en las condiciones probadas fue baja (cerca del 10%), en comparación con otros protocolos reportados (20-30%, Park *et al.*, 2003; Pino *et al.*, 2010; Van *et al.*, 2010). La baja eficiencia observada en la transformación pudo deberse a las condiciones ensayadas, al tipo de explante, o al gen, por lo que solamente plantas transformadas con la construcción *35S::SISPT2-AS* fueron transgénicas.

Los análisis de expresión de *SISPT2* en plantas *35S::SISPT2-AS* mostraron una ligera disminución en el transcrito, indicando que el silenciamiento producido por la construcción antisentido había funcionado. Se ha reportado que el silenciamiento producido por este tipo de construcciones va desde el 10 hasta el 90% (Tieman *et al.*, 1992). A pesar de que no se observó una severa disminución en el transcrito, el

silenciamiento producido por la construcción pareció afectar el fenotipo. Los frutos de 20 dpa de plantas de tres diferentes líneas *35S::SISPT2-AS* mostraron diferentes fenotipos los cuales incluyeron una reducción en el tejido locular que rodea a la placenta, un reducido número de semillas y un aumento en el número de lóculos (Figura 13). Sin embargo, los fenotipos no fueron consistentes en las tres líneas analizadas por lo que la generación de más plantas de la misma línea es necesaria para corroborar estos fenotipos.

Las citocininas desempeñan diferentes papeles durante el desarrollo del fruto. Previamente se ha reportado que las citocininas desempeñan un papel durante el desarrollo del gineceo y fruto de *Arabidopsis*, induciendo la proliferación de tejido en la región media del gineceo y uno tardío durante la formación de los márgenes de las valvas del fruto (Marsch-Martínez *et al.*, 2012). Adicionalmente, se les ha atribuido un involucramiento en procesos de división celular (Gillaspy *et al.*, 1993; Srivastava y Handa, 2005).

En el presente trabajo la función de las citocininas durante el desarrollo temprano del fruto de tomate fue investigada utilizando la línea reportera sintética *TCS::VENUS* para visualizar la respuesta transcripcional a esta hormona. Tal como se mostró en la Figura 15, la señal de fluorescencia fue detectada en placenta y óvulos, sugiriéndonos un posible papel durante el desarrollo de estos tejidos. Resultados similares se observaron en la línea *ARR5::GUS*, cuya expresión durante el desarrollo del ovario fue específica en placenta (Figura 17). Reportes anteriores en mutantes *ckx* de *Arabidopsis*, las cuales tienen mayores niveles endógenos de esta hormona, mostraron un mayor número de óvulos y semillas en frutos, indicando un papel de las citocininas durante el desarrollo de la placenta (Bartrina *et al.*, 2011).

La señal de fluorescencia observada durante el desarrollo del ovario, indica un posible rol de las citocininas durante el desarrollo temprano del fruto de tomate, sin embargo, experimentos funcionales serán necesarios para corroborar esto.

Cuando las citocininas exógenas fueron aplicadas a ovarios de las líneas *TCS::VENUS* y *ARR5::GUS*, se observó un incremento en la fluorescencia y expresión, indicando que las citocininas aplicadas exógenamente son capaces de

desencadenar la señalización de citocininas a nivel interno. Resultados similares fueron observados en *Arabidopsis*, donde la aplicación exógena de citocininas incrementó la señal de fluorescencia de *TCS::GFP* en la región media del gineceo (Marsch-Martínez *et al.*, 2012).

Se ha reportado que las citocininas y auxinas actúan sinérgica o antagónicamente en el control de diferentes procesos de desarrollo en planta. Experimentos de Skoog y Miller (1957) demostraron que el balance entre auxinas y citocininas es clave en la organogénesis *in vitro*; ellos observaron que altos niveles de citocininas inducen la generación de brotes adventicios, mientras que altas concentraciones de auxinas promueven la formación de raíz. Adicionalmente, la interacción entre estas hormonas se ha reportado necesaria para la regulación y desarrollo de meristemos (Su *et al.*, 2011).

La interacción entre auxinas y citocininas sugiere una interrelación entre sus vías de respuesta. Se ha reportado que las auxinas regulan la biosíntesis de citocininas y que inducen la regulación negativa de genes de la vía de señalización de las citocininas en diferentes tejidos (Nordstrom *et al.*, 2004). Las citocininas, por su parte, inducen a reguladores negativos de la vía de auxinas y afectan el transporte de éstas (Jones *et al.*, 2010). Debido a esas interacciones negativas, se han reportado con frecuencia patrones opuestos de localización de auxinas y citocininas en varios tejidos (Muller y Sheen, 2008).

En el contexto de desarrollo de fruto, los análisis con líneas reporteras de la señalización de auxinas y citocininas en *Arabidopsis*, mostraron patrones opuestos en etapas y tejidos específicos durante el desarrollo del gineceo y fruto (Marsch-Martínez *et al.*, 2012). En este trabajo se observó un patrón similar. Al comparar los patrones de fluorescencia de las líneas de señalización a auxinas *DR5::VENUS* y citocininas *TCS::VENUS* se observó que la señal de cada hormona es específica a un tejido y etapa de desarrollo en particular (Figura 18). Sin embargo, en óvulo la señal de fluorescencia de ambas líneas fue detectada, en una región específica, sugiriendo un papel complementario durante el desarrollo de ese tejido.

Previamente fue reportado un papel de las auxinas durante el desarrollo de óvulos en tomate (Pattison y Catala, 2012) pues se encontró señalización a esta hormona en el saco embrionario de óvulos durante el desarrollo de ovario, tal como se observó aquí (Figura 18). Adicionalmente, la acción de las auxinas, citocininas y giberelinas se ha reportado que es esencial para que la fructificación y crecimiento del fruto de tomate se lleve a cabo (Gillaspy *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 2013), indicando que la interacción entre éstas hormonas es necesaria en diferentes procesos durante el desarrollo de fruto.

La acción de las citocininas en los diferentes procesos en los que ha sido involucrada, requiere una correcta regulación. En los últimos años la vía de señalización de esas hormonas ha sido establecida (El-Showk *et al.*, 2013). Esta vía incluye elementos que regulan la respuesta a las citocininas, los reguladores de respuesta; RR, los cuales con frecuencia son utilizados como marcadores de la señalización de ese tipo de hormonas (Shani *et al.*, 2010).

En *Arabidopsis*, hay RR de dos tipos: los de tipo A, que funcionan como reguladores negativos de la vía de señalización, y los de tipo B, que actúan como factores de transcripción. Los RR de tipo A han mostrado ser fácilmente inducidos por la aplicación de citocininas (D'Agostino *et al.*, 2000; Shani *et al.*, 2010). Un comportamiento similar fue observado aquí (Figura 19 y 20), sugiriendo que la respuesta a citocininas se vio afectada como se esperaba. Adicionalmente, los RR de tipo B no mostraron un cambio en sus niveles de expresión (Figura 19 y 20), lo cual concuerda con trabajos previos en *Arabidopsis*, indicando que el comportamiento de los RR funciona de manera similar en ambas especies.

Recientemente se estableció una relación entre la vía de señalización de las citocininas y *SPT* en *Arabidopsis*, en la cual *SPT* es necesario para la señalización (de Folter, com. personal). Estudios previos han mostrado un cambio en la expresión de *SPT* en respuesta a las citocininas. En este trabajo, al analizar el comportamiento de *SISPT1* y *SISPT2* en respuesta a cambios en los niveles endógenos y exógenos de citocininas, no se observó un efecto, a pesar de que en los promotores de ambos genes existen motivos de unión a esta hormona, sugiriéndonos que tal vez parte del

modelo de regulación con las citocininas no se encuentra conservado, o quizá sea otro mecanismo a través del cual *SISPT* pueda estar relacionado con citocininas durante el desarrollo temprano del fruto en tomate. Sin embargo, análisis que determinen la interacción entre *SISPT* y genes de la señalización de citocininas son necesarios para corroborar esto.

7. CONCLUSIONES

SISPT1 y *SISPT2* son expresados de manera diferencial durante el desarrollo del fruto de tomate y podrían actuar de manera redundante en etapas específicas de desarrollo.

Las citocininas podrían desempeñar un papel en placenta y óvulos durante el desarrollo temprano del fruto de tomate.

Las auxinas y citocininas podrían actuar de manera complementaria en el desarrollo de óvulos en la etapa 9 de la formación del ovario de tomate.

El comportamiento de los reguladores de respuesta de la vía de señalización de las citocininas en respuesta a esas hormonas se encuentra conservada entre tomate y *Arabidopsis*.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar análisis de hibridación *in situ* para determinar la expresión espacio-temporal de los genes *SISPT1* y *SISPT2*.
- Probar otras técnicas de transformación para la generación de plantas transgénicas silenciadas, para determinar la función de los genes *SISPT1* y *SISPT2*.
- Realizar experimentos para corroborar la función de las citocininas en el desarrollo de la placenta durante el desarrollo del ovario de tomate.
- Realizar ensayos para determinar la relación entre *SISPT* y genes de la vía de señalización de citocininas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez J., Smyth D. (2002) *CRABS CLAW* and *SPATULA* genes regulate growth and pattern formation during gynoecium development in *Arabidopsis thaliana*. Int. J. Plant Sci. 163: 17-41.
- Azzi L., Deluche C., Gévaudant F., Frangne N., Delmas F., Hernould M., Chevalier C. (2015) Fruit growth-related genes in tomato. J. Exp. Bot. 66: 1075-1086.
- Bartrina I., Otto E., Strnad M., Werner T., Schmulling T. (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 23: 69–80.
- Bemer M., Karlova R., Ballester R., Tikunov M., Bovy G., Wolters-Arts M., Rossetto Pde B., Angenent C., de Maagd A. (2012) The tomato *FRUITFULL* homologs *TDR4/FUL1* and *MBP7/FUL2* regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. Plant Cell 24: 4437-4451.
- Busi M., Bustamante C., D'Angelo C., Hidalgo-Cuevas M., Boggio S., Valle E., Zabaleta E. (2003) MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. Plant Mol. Biol. 52: 801–815.
- D'Agostino B., Derue`re J., Kieber J. (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. Plant Physiol. 124: 1706–1717.
- Ding J., Chen B., Xia X., Mao W., Shi K., (2013) Cytokinin-induced parthenocarpic fruit development in tomato is partly dependent on enhanced gibberellin and auxin biosynthesis. PLoS ONE 8(7): 1-11.
- Dorcey E., Urbez C., Blázquez M., Carbonell J., Perez-Amador M. (2009) Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellins metabolism in *Arabidopsis*. Plant J. 58: 318–332.
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res. 19: 1349.

- El-Showk S., Ruonala R., Helariutta Y. (2013) Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Devel.* 140: 1373-1383.
- Gillaspy G., Ben-David H., Gruissem W. (1993) Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* 5: 1439–1451.
- Giovannoni J. (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 725–749.
- Groszmann M., Paicu T., Smyth D. (2008) Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in Arabidopsis. *Plant J.* 55: 40–52.
- Groszmann M., Paicu T., Alvarez P., Swain M., Smyth D. (2011) SPATULA and ALCATRAZ, are partially redundant, functionally diverging bHLH genes required for Arabidopsis gynoecium and fruit development. *Plant J.* 68 (5):816-829.
- Heisler M., Atkinson A., Bylstra Y., Walsh R., Smyth D. (2001) SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Devel.* 128: 1089-1098.
- Jefferson R., Kavanagh' T., Bevan M. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Jones B., Gunneras A., Petersson V., Tarkowski P., Graham N., May S., Dolezal K., Sandberg G., Ljung K. (2010) Cytokinin regulation of auxin synthesis in Arabidopsis involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell* 22: 2956-2969.
- Karlova R., Chapman N., David K., Angenent C., Seymour G., de Maagd A. (2014) Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *J. Exp. Bot.* 65: 4527-4541.
- Knapp S. (2002) Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J. Exp. Bot.* 53: 2001-2022.
- Kourmpetli S., Drea S. (2014) The fruit, the whole fruit, and everything about the fruit. *J. Exp. Bot.* 65: 4491-4503.

- Kumar R., Khurana A., Sharma K. (2014) Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *J. Exp. Bot.* 65: 4561-4575.
- Liljegren S., Roeder A., Kempin S., Gremski K., Østergaard L., Guimil S., Reyes D., Yanofsky M. (2004) Control of Fruit Patterning in *Arabidopsis* by *INDEHISCENT*. *Cell* 116: 843–853.
- Lozano R., Gimenez E., Cara B., Capel J., Angosto T. (2009) Genetic analysis of reproductive development in tomato. *Int. J. Dev. Biol.* 53: 1635-1648.
- Marsch-Martinez N., Ramos-Cruz D., Reyes-Olalde J., Lozano-Sotomayor P., Zuniga-Mayo V., de Folter S. (2012) The role of cytokinin during *Arabidopsis* gynoecia and fruit morphogenesis and patterning. *Plant J.* 72: 222–234.
- Mariotti L., Picciarelli P., Lombardi L., Ceccarelli N. (2011) Fruit-set and early fruit growth in tomato are associated with increases in indoleacetic acid, cytokinin, and bioactive gibberellin contents. *Plant Growth Reg.* 30: 405-415.
- Matas A., Yeats T., Buda G., Zheng Y., Chatterjee S., Tohge T., Ponnala L., Adato A., Aharoni A., Stark R., Fernie A., Fei Z., Giovannoni J., Rose J. (2011) Tissue- and cell-type specific transcriptome profiling of expanding tomato fruit provides insights into metabolic and regulatory specialization and cuticle formation. *Plant Cell* 23: 3893–3910.
- McAtee P., Karim S., Schaffer R., David K. (2013) A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Front. Plant Sci.* 4 (79): 1-7.
- Moubayidin L., Østergaard L. (2014) Dynamic control of auxin distribution imposes a bilateral-to-radial symmetry switch during gynoecium. *Devel. Curr. Biol.* 24: 2743–2748.
- Muller B., Sheen J. (2008) Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* 453: 1094-1097.
- Nitsch M., Oplaat C., Feron R., Ma Q., Wolters-Arts M., Hedden P., Mariani C., Vriezen H. (2009) Abscisic acid levels in tomato ovaries are regulated by *LeNCED1* and *SICYP707A1*. *Planta* 229: 1335-1346.
- Nordstrom A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek R., Astot C., Dolezal K., Sandberg G. (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*

- thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. Proc. Natl. Acad. Sci. 101: 8039-8044.
- Okabe Y., Asamizu E., Saito T., Matsukura C., Ariizumi T., Bres C., Rothan C., Mizoguchi T., Ezura H. (2011) Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. Plant Cell Physiol. 52: 1994-2005.
- Orzaez D., Medina A., Torre S., Fernandez-Moreno J., Rambla J., Fernandez-Del-Carmen A., Butelli E., Martin C., Granell A. (2009) A visual reporter system for virus-induced gene silencing in tomato fruit based on anthocyanin accumulation. Plant Physiol. 150: 1122-1134.
- Orzaez D., Mirabel S., Wieland W., Granell A. (2006) Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. Plant Physiol. 140: 3-11.
- Pabón-Mora N., Ka-Shu G., Ambrose B. (2014) Evolution of fruit development in flowering plants. Front. Plant Sci. 5: 1-24.
- Park S., Morris J., Park J., Hirschi K., Smith R. (2003) Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. Plant Physiol. 160: 1253-1257.
- Pattison R., Catala C. (2012) Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the *PIN* and *AUX/LAX* gene families. Plant J. 70: 585-598.
- Pattison R., Csukasi F., Zheng Y., Fei Z., van der Knaap E., Catala C. (2015) Comprehensive tissue-specific transcriptome analysis reveals distinct regulatory programs during early tomato fruit development. Plant Physiol. 168: 1684-1701.
- Pino L., Lombardi-Crestana S., Azevedo M., Scotton D., Borgo L., Quecini V., Figueira A., Peres L. (2010) The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato Micro-Tom model system. Plant Methods 6:23.
- Serrani J. (2008) Interacción de giberelinas y auxinas en la fructificación del tomate. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 114pp.

- Seymour G., Manning K., Eriksson E., Popovich A., King G. (2002) Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *J. Exp. Bot.* 53: 2065-2071.
- Seymour G., Østergaard L., Chapman N., Knapp S., Martin C. (2013) Fruit development and ripening. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 219-241.
- Shani E., Ben-Gera H., Shleizer-Burko S., Burko Y., Weiss D., Ori N. (2010) Cytokinin regulates compound leaf development in tomato. *Plant Cell* 22: 3206–3217.
- Skoog F., Miller C. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 54: 118–130.
- Srivastava A., Handa A. (2005) Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *Plant Growth Regul.* 24: 67–82.
- Su Y., Liu Y., Zhang X. (2011) Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Mol. Plant* 4: 616-625.
- Tani E., Tsaballa A., Stedel C., Kalloniati C., Papaefthimiou D., Polidoros A. (2011) The study of a SPATULA-like bHLH transcription factor expressed during peach (*Prunus persica*) fruit development. *Plant Physiol. Biochem.* 49: 654–663.
- Tieman D., Harriman R., Ramamohan G., Handa A. (1992) An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell* 4: 667-679.
- Tisza V., Kovács L., Balogh A., Heszky L., Kiss E. (2010) Characterization of *FaSPT*, a *SPATULA* gene encoding a bHLH transcriptional factor from the non-climacteric strawberry fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 822-826.
- Toledo-Ortiz G., Huq E., Quail P. (2003) The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15: 1749-1770.
- Tomato Genome C. (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635-641.
- Van D., Ferro N., Jacobsen H. (2010) Development of a simple and effective protocol for *Agrobacterium tumefaciens* mediated leaf disc transformation of commercial tomato cultivars. *GM Crops* 1: 312-321.

Vrebalov J., Pan I., Arroyo A., McQuinn R., Chung M., Poole M., Rose J., Seymour G., Grandillo S., Giovannoni J., Irish V. (2009) Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *Plant Cell* 21: 3041-3062.

Xiao H., Radovich C., Welty N., Hsu J., Li D., 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 Biol.* 9: 1-21.

10. ANEXOS

ANEXO 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *SISPT1*, *SISPT2* y los *TRR*.

Gen	Orientación (5'- 3')	Secuencia	Amplicón (pb)
Solyc02g093280.2 <i>SISPT1</i>	F	CCA AGA CGC CTC GTT AAA TG	338
	R	CAC CAA ACT GAT ATC GAA GC	
Solyc04g078690.2 <i>SISPT2</i>	F	CAGTCGGTGCAACTTCCATC	369
	R	CACCCCATCTACACCAACTCCTCG	
Solyc04g078690.2 <i>SISPT2</i>	F	CCTCACGCTTCTTCATCTCTCG	900
	R	CACCCCATCTACACCAACTCCTCG	
Solyc01g065540.2 <i>TRR1</i>	F	CCAGGCAGCAATCTTTGTCATC	314
	R	GTTCTGCGGTTTTGGCTGCT	
Solyc05g054390.2 <i>TRR2</i>	F	TGGTCGGTGGAGCTTCATCA	336
	R	AGACCTACCTAATGCAGCCG	
Solyc05g006420.2 <i>TRR3/4</i>	F	TGGAAGAAGGCGCTGAAGAT	328
	R	CGTCTTGTTGGTGATGTTGG	
Solyc06g048930.2 <i>TRR 16/17</i>	F	GGTCTAAGGGCGTTGGAGTA	286
	R	GACATCGTAACCTCTTCACATC	
Solyc03g078400.2 <i>ACTINA 7</i>	F	CCTCAGCACATTCCAGCAG	192
	R	CCACCAAACCTTCTCCATCCC	

ANEXO 2. Medios de cultivo utilizados en la transformación genética de tomate.

Composición (g L ⁻¹)		Medios				
		Germinación	Resusp.	RIM	SIM	Elongación
Sales MS	4.45	X	X	X	X	X
Agar	6	X		X	X	X
Sacarosa	15	X	X	X	X	X
Meropenenem	0.025				X	X
Kanamicina	0.025				X	X
Acetosiringona	100 µM		X	X		
Ácido naftalenacetico (ANA)	0.04 µM			X		
Zeatina	10 µM				X	

ANEXO 3. Motivos de unión de citocininas a los promotores de *SISPT1* y *SISPT2*.

Los motivos de unión son resaltados en negro.

Promotor de *SISPT1*(2 kb)

TTACTCAAAATGTTTATAAAATATTTGGAAAATTTACGGTAAAAATAAACTTGTTTAACTCTTGAAATTCGAAAGGAGACATATAAAATGGGACGGAGGTAGTAACATAAGTTACAAAAATTTAAATTTAATGTGCAAATTTTCGATCAAATCGAAATGTTTCTCTTCAAAAAATGAAAAGTTTCATATAAAATGAGACAGAGAGAGTAACATCAATATCAACAAGTATAGAGAATATATATATAGAGAGAGAGAGAGAAAATCTTTTGGCTAGAAAATTTGATTATTTGGTCAAATTAGTAAAAATAACATATTTTACTATGATATTTTATCTTTTTGAATATTTTCATCTTTTTAACTCTAATACCATAAAATTTAAAAATAAAAAAGTATCAGATTATTTTACAGTAAATAACAACATTTTACACTTTTGAAAATTTCTAGTCAAATTTCTGGTTATATAGCATTATCTATCTATTTATCTATATATATATATATATATACAAAAATATGCAAATACGTTAATGATTAAAACTATTTACTCACATGCTAAATAAATTTATGATAAAAAATATATTTATGTACATATAATTTTTGGACAAATGATATTCATTTGACCATTTGGAGTAACATAGTTGTATCAATAAAGTTTTCAAAAGATTAAAAATGAAGAGAAAGTACTACACTTAGGTATTTGATTAGTAACTCTGTTTGGAAAGCGACTAGTCATTATAATTGAGGAATCAAATGATTTTCTGCTGCTATTTTTCACATTACATTGAATTGGTAAGTAAGAAAATGCAGGACATCGTGTCTTTCTTTATCAAATTAACCTCCCTACACACATAGCCTGCGACTATAAAGCCTATCAATCAATTGAAACAAGGGAATGGAGTTGTTGGCCTTGCTGAAAACATGTTTATTAATCTGTCTTAGGAGTACGATTGTACTTTTCTCCTTAATCAGAAAGTTTTAAATATATTTTTTTTTAAATAGGAAGCATTATCTTGAATAAGGCTTTATCTAACGAGATTGTTGTCTATAAAATTTCTAAATGTTGCCAACTTATTGATTTTATTATAAACTCATTAGTTTTAAAAAGTGATGTGTCAAAACAAAATGTCAATGAACATTCAATCTTTTCCTCTGAACCTCAAAGGAGTCTACTTTTTCTTTATGAATATTAATTTCTTATGTCCCAATTTTAAATTTATCATAGTTGCTTCAATAATTGATAAATTTACGATAGATCTAAAGATTAATGTTATATTAATTTTTTAAAAAAATATATCTAAAACCTTATACATACACTCTGGTCTTATCGTGCCACTTTTTATCTATGGAGAGTCAACTTAAATAACTTTAAAAATTAATTTAGACTAAAATAACTTTGGTATATTCTAAAAATCATAAGTTGGTACAGTAGTTATTTTCGGACCAGAAGTGGGGTAAGCAGCAATCGTGTTTTCAAAAATACTTTAGAAAACATAAAGAAAAGTAAAAAGGAGAGCACAAATGGATACTGAAATGGAACAGTGTTCGATTAAGTGTAACGTATATACTCTCTCTGGAACGAGCTAGTTGAAGAGCATGCCTACAATTTGTGCTTCACGTGTGCCAGAAAGTTGGCTTCACCTGACACTATCACTATATAAAACCACTCCATCAAATTGAACCTTAATTTAATTCGATAAAAAATTTTTGAATTTTATGATTTTAAATTAATAAATTTGTGAAAGACCTATGATTTTAAATTTGATACAACGGAAGTAACAATTTGACTATTAACCTGTGATTTCTTTGATTTGGTTTTACGAGTTTACC AACTTCCCTAATTCATCAGTTCTCAGAACCAAAAAGTAGACCAGTCAAAGTCTAATCAACTTGCTAGTTTTACCCCTACTCTGTTAATTCAAATGGTTTTATTCACTTAATGCGAATCCGCCACTCTGCTCTATATGGTATGGTTGGCTAATAAATACACA

Promotor de *SISPT2*(2 kb)

CCTATTTTCATACATTTCTAGCATCGTATCTACATCGAAAAACAATCTCTCTATCCCACCAAGGTAGACGTAAGGTTGTATG
CATGTATCATAACCCTTTCTAGATCCAATTTGCGGGATTACATTAGAAGGTACATCTAATCCTCTCTGGATTCCCTCTCAT
GGAATCATATAAATTATGCGATCTATATTGTGATTTTGAAAGGGTGTAATAGACTCTTTTTGAAACAAAGGATAAGTTT
GACTGAGGGTGTCAATCAATTCACCTTTACCTGACCTAAGGGTGATTGAGCTAGTGTAGCACATGTGATCTCAATTTCAA
TCGACTCTACGTCTTCTAAGAATGATTGAATTGATGCAACACGTATATTAGATACCTCAAAGCACTACTAGTAATTATG
TTCTTCTAAAGTCATAAATCACTTTAAAGGTAGATTGTTGGGGGCAAGTGCGCATCTAATAGCAGAGTAGTTGAGCTAG
TTGGAAGAAAAAAGATAAGAGAGACGTAACGTATTCTTTTATTCCCATTATACATAAATTGATAATACTAATTTATTA
AGATTTGTAAGTGGTAACCATAGCATACAATTGGCAGCCAATTTGATATTTTAGTATAGATATTAATAAATAATATATA
GGATGGCTAGCAAAAACAAGCATTTAACTATATGGCCACTTGTTTGAATTCAAAACAAAAACTAAATACAGATTAATT
GGTGACGAAGAATGTTGACAACCTCCCTTCTCTTTTTTTCTGCTCATTATAAACAACCATAGACAATAAAACCATTGAAC
CAAGTCCCAACCAACCTCATTTAACCGTACAGTGTAATCTTACCAGTGAGGTCTGAGTTGAAAATTTGTTATTGAAATCT
AAGTTGAAAAAATAACAATAGCAAAACAGACATGTTAAAAATAAAAGGAAGAAAAGATAGTAACGATAACAATAATAT
AGTAATCGAGAATTATTAATAATAATAAAATAAGAAAGGTCACCGACCTCGGGAACATAAATTGGTTGTTCAAAAATAAT
AATTTTTTCCAGTTATTATGGCATCCAAATGGATAAGGTTATCAAGAAGAAAGGTGGACTGATTCATTCATAAAATCAT
ATTCAATTCAATTTGGGTTGCTGACTAAAATCCAAAGAGATCATCATTCTGCCAGAAAATCTACATGGATTTTTTGTAT
GTTTTCTCCAACACTACTCCTAACACAATCTTGATATTTTTAAAAAATAAAGATAATCAATTTATGTTATGCACAAAGA
AGAGTAGACTTCACTAGTTGTTACTGCACTATTATTTGGTATATTCTCCATTTCAATCAACATGAAAAGTATCAATGAAT
TAGTTACACAAAAATATAGGGCAATTCGTGAAATTAGTCGAGTTTCGAATTAGTCAAGTTATATGTTTCTCTTTCTATG
ATAAGATGATTGTATCATTAATTTAATTAATTTGTGAGAATGGTTTTTTTTTATAAGAACACTGTATTCTCTTAATAAACA
TATGTGACACAAATTCAAATTAGTTACGTTGATATATTTGAAATCTAAATCCCTTTGTTTCCATCGTTCCCTAATGAGAT
GATTGACAAC TACAAGTTTCAAAAATTTGTTTCTTCTTTAAATTTTCAATCAAGTCAAATAATATCACATTAATTAATA
CAAAAATCGTATATATTTGAATATTTGAAAAAGGGTCAACGTATGGGATAATTTTAATAGGAATTAATAATTTACTATGA
TTTCATGCTCTTTATTCTGTTTTCTACTATTTCTCATCATATCTTTGATCCAAATTCCAAATTAACGAAGAAATAAA
CAAAATAGGGACTTAATTGATAGAAATGAAAAATATTAGGTTTGTATTTGCCTATTCTGATAGTATAAGGAGGTGATGTGT
AATTTAGTAATCTATTAGGACGCTAAACGTATTATCCTTTATAAATCAGGTGATAAATTCAAATTAAGCAATTTTCAAAA
C