



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Análisis de la expresión del gen *SIMYB* durante el desarrollo
reproductivo de tomate (*Solanum lycopersicum*)**

Trabajo final de Máster presentado por

José Ricardo Linares Gonzáles

Directores

Dra. Concha Gómez Mena

Dr. José Pío Beltrán Porter

Valencia, 2016

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores José Pío Beltrán y Luis Cañas, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación en el laboratorio de Biología Reproductiva y Biotecnología de Plantas.

Mi aprecio especial a mi asesora de Trabajo de Fin de Máster Dr. Concha Gómez Mena, porque me apoyó en todo momento para que yo pudiera realizar este trabajo, gestionando y revisando mis avances tanto en la parte experimental como en la redacción.

Al equipo de investigación del laboratorio: Edelín, Maricruz, Mónica por sus acertadas indicaciones para que pueda realizar adecuadamente la parte experimental y que el ambiente de trabajo sea grato.

A mis amigas investigadoras por darme ánimos en todo momento para concluir este trabajo: Rim, Sandra, Rosa y Marina.

A mi amigos del máster: Marina, Pablo, Kristy, Ailín, Miguel, los chicos gallegos Pablo y Andrés porque además de compartir inquietudes académicas también hemos formado lazos de amistad.

Agradecimiento especial a Marisol y María Dolores por su ayuda y cooperación para llevar a cabo los estudios citológicos.

Al coordinador del máster José Miguel Mulet por apoyarme en todo momento con la documentación para que pudiera postular en tiempo récord a una beca de maestría.

Un agradecimiento especial a mis padres y hermanos, porque aunque estaban lejos siempre me daban ánimos. A mi tía Elisa y mi prima Nathaly por el calor de hogar en Navarra aunque este lejos de casa.

A mis amigos Dany, Vladimir y Yenny por escucharme y alentarme como amigos que son.

Y finalmente a la Oficina de Becas de Perú, PRONABEC, porque ellos contribuyeron económicamente para que pudiera cursar este máster y seguir formándome académicamente.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABLAS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
A. EL TOMATE	7
1. Clasificación taxonómica	7
2. Características Generales.....	8
3. Morfología del fruto.....	8
4. Desarrollo y cuajado del fruto.....	9
5. Control hormonal de la fructificación	10
6. Factores de transcripción implicados en el desarrollo del fruto.....	11
7. Factores de transcripción tipo MYB	13
8. Proteínas MYB en plantas	14
9. El tomate como sistema modelo para estudios de desarrollo.....	15
B. ANTECEDENTES	16
II. OBJETIVOS.....	18
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
A. MATERIAL VEGETAL	19
1. Condiciones de cultivo	19
B. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL PARA MICROSCOPÍA	21
1. Fijación del tejido vegetal	21
2. Inclusión del tejido vegetal en parafina	21
3. Microscopía óptica	21
C. CEPAS BACTERIANAS.....	22
1. Transformación de cepas bacterianas	22
D. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	22
1. Extracción de DNA plasmídico	22
2. Extracción de DNA genómico	22
3. Amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22

E.	TÉCNICA DE CLONACIÓN	23
1.	Plásmidos utilizados	24
2.	Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos de DNA.....	24
3.	Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	24
F.	Hibridación <i>in situ</i>	24
1.	Generación de sondas marcadas con digoxigenina	24
2.	Cuantificación de la sonda	25
3.	Procesamiento de las muestras	25
4.	Prehibridación e hibridación	25
5.	Lavados e inmunodetección colorimétrica	26
G.	Transformación de plantas.....	26
1.	Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> y análisis de plantas transgénicas	26
2.	Transformación de <i>Solanum lycopersicum</i> (cv. Moneymaker)	27
H.	Protocolo de tinción GUS.	30
IV.	RESULTADOS	31
A.	Análisis del patrón de expresión espacio temporal del gen <i>SIMYB</i> en <i>Solanum lycopersicum</i>	31
1.	Caracterización de las plantas transgénicas.....	33
B.	Localización del transcrito del gen <i>SIMYB</i> mediante hibridación <i>in situ</i>	35
C.	Análisis del patrón espacio temporal del gen <i>SIMYB</i> en <i>A. thaliana</i>	37
V.	DISCUSIÓN.....	39
1.	El gen <i>SIMYB</i> se expresa en los tejidos reproductivos de la flor en tomate	39
2.	Un fragmento de 2Kb del promotor del gen <i>SIMYB</i> dirige la expresión del gen delator <i>uidA</i> a anteras y estilo en <i>Arabidopsis</i>	40
VI.	CONCLUSIONES	43
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
VIII.	GLOSARIO DE TÉRMINOS BOTÁNICOS:	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Flor de tomate (<i>Solanum lycopersium</i> cv. Moneymaker).	8
Figura 2: Corte transversal de un fruto de tomate	9
Figura 3: Diferentes estadios del desarrollo del tomate y detalles anatómicos.....	10
Figura 4: Visión esquemática de los reguladores transcripcionales en el desarrollo y maduración de los frutos carnosos	12
Figura 5: Clases de proteínas MYB	14
Figure 6. Expresión relativa del gen <i>SIMYB</i> en tomate silvestre cv. Micro-Tom.....	17
Figura 7: Construcción utilizada para transformar tomate y Arabidopsis. Esta construcción contiene el gen nptII el cual confiere resistencia a kanamicina en las plantas y 2 Kb de la secuencia promotora del gen <i>SIMYB</i> , responsable de dirigir la expresión del gen <i>uidA</i>	32
Figura 8: Gel de agarosa al 1% para comprobar la inserción de la construcción <i>pSIMYB::GUS</i> . 32	
Figura 9: Respuesta organogénica de explantes de cotiledón inoculados con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
Figura 10: Genotipado de las plantas transgénicas de tomate.....	34
Figura 11: Genotipado de las plantas transgénicas de tomate.....	34
Figura 12: Producto de digestión de pCR8-(<i>SIMYB</i>) 290pb con enzima <i>EcoRI</i>	35
Figura 13: Localización del transcrito del gen <i>SIMYB</i> en flores de tomate cv. Moneymaker mediante hibridación <i>in situ</i>	36
Figura 14: Localización del transcrito del gen <i>SIMYB</i> en flores en anthesis de tomate cv. Moneymaker mediante hibridación <i>in situ</i>	37
Figura 15: Patrón de expresión del gen <i>SIMYB</i> en flores de <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
Figura 16: Expresión del gen reportero <i>uidA</i> dirigida por el promotor del gen <i>SIMYB</i> . Corte longitudinal de flor de <i>A. thaliana</i>	38
Figura 17: Expresión del gen reportero <i>uidA</i> dirigida por el promotor del gen <i>SIMYB</i> . Corte transversal de flor de <i>A. thaliana</i>	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la solución nutritiva utilizada en el fertirriego.....	19
Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas.....	22
Tabla 3. Antibióticos usados para la selección de las colonias bacterianas recombinantes.	22
Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de fragmentos.	23

ABREVIATURAS

μg	Microgramo	mm	milímetro
μL	Microlitros	mM	milimolar
μm	Micrometros	MS	medio Murashige y Skoog
ABA	Ácido abcísico	N	Normal
ARF	AUXIN RESPONSE FACTOR	nm	nanómetro
BSA	Albúmina de suero bovino	ntplI	neomicina fosotransferasa
cDNA	DNA complementario	°C	grados centígrados
cm	centímetros	pb	pares de base
cv.	cultivar	PBS	tampón fosfato salino
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico	qRT-PCR	<i>Real time quantitative PCR</i>
EDTA	Etilen-diamino-tetraacetato sódico	r.p.m	revoluciones por minuto
FAO	Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura	RNA	Ácido ribonucleico
g	gramo	RNasa	Ribonucleasa
GAs	giberelinas	s	segundo
h	hora	SDS	Dodecil sulfato sódico
IAA	Ácido indolacético	SSC	Solución salina citratada
kV	kilovoltio	TBE	Tris-borato-EDTA
LB	LuriaBertani (medio de cultivo)	Tris	2-amino-2-hidroximetil- 1,3propanodiol
M	molar	UFC	Unidades formadoras de colonias
mg	miligramo	voltio	voltio
min	minuto	UV	ultravioleta
mL	mililitro		

RESUMEN

Las plantas son organismos sésiles y su éxito reproductivo depende del correcto desarrollo de flores, frutos y semillas.

En tomate el cuajado y desarrollo del fruto es un proceso altamente regulado a nivel genético que puede verse afectado negativamente por cambios en las condiciones ambientales principalmente humedad y temperatura. El conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan el cuajado y desarrollo del fruto es muy importante para identificar dianas de mejora para este cultivo.

Los procesos de desarrollo en plantas están a menudo controlados por redes de genes reguladores que codifican factores de transcripción. En un trabajo anterior del laboratorio se identificó un factor de transcripción tipo MYB (*SIMYB*) cuya expresión se induce en plantas de tomate androestériles cuyos ovarios se desarrollan en ausencia de polinización dando lugar a frutos sin semillas (partenocárpicos). Mediante análisis de expresión se determinó que este gen se expresa únicamente en flores en desarrollo.

En este trabajo hemos determinado el patrón tisular del gen *SIMYB* durante el desarrollo de la flor de tomate. Nuestros resultados muestran que el mensajero de este gen se localiza en el tejido esporogénico de la antera, en los óvulos en desarrollo y en el tejido de transmisión del pistilo. Por otra parte, se han obtenido líneas transgénica de *Arabidopsis* p*SIMYB*::GUS que muestran que una secuencia de 2 kb del promotor del gen *SIMYB* es capaz de dirigir la expresión del gen delator GUS a los tejidos de la antera y del estilo.

La técnica de hibridación *in situ* y las fusiones con GUS son muy adecuadas para obtener información acerca de los patrones de expresión de los genes en plantas. Nuestros resultados contribuirán a entender la función del gen *SIMYB* durante el desarrollo reproductivo en tomate.

I. INTRODUCCIÓN

A. EL TOMATE

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*) es originario de la región Andina, actualmente abarcado por Chile, Bolivia, Ecuador, Colombia y Perú. El tiempo y lugar de domesticación de ese cultivo aún no se conoce con certeza (Bai y Lindhout, 2007) aunque se presume que México fue la región más probable de domesticación y el Perú un centro de diversificación para especies silvestres (Larry y Joanne, 2007). El tomate es una hortaliza que ocupa el primer lugar en el mundo en cuando a consumo por ser fuente importante de nutrientes para la dieta humana (Bauchet and Causse. 2010), por tanto presenta un alto valor económico. Actualmente se cultivan numerosas variedades e híbridos de tomate que se han ido desarrollando como respuesta a la demanda diversa que presenta el mercado, ello en parte debido a la comprensión y manejo de las fuentes de diversidad genética de esta planta. Fuentes de la FAO estiman que la producción mundial de tomate en el 2011 fue de aproximadamente 160 millones de toneladas en un área cultivada de aproximadamente 4.8 millones de hectáreas. (FAOSTAT 2011)

1. Clasificación taxonómica

Desde una perspectiva botánica el tomate es una fruta, a pesar de ello, contiene muchos azúcares, comparada con otras frutas. Sus genes están distribuidos en 12 cromosomas. El tomate pertenece a la familia Solanácea, la cual contiene más de 3000 especies, algunas plantas de importancia agronómica como la patata, la berenjena y el pimiento y organismos modelo como el tabaco y la petunia.

La taxonomía del tomate es la siguiente (Foolad, 2007):

REINO:	Plantae
Subreino:	Traqueobionta
Superdivisión:	Espermatophyta
Clase:	Magnoliópsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Suborden:	Solanineae
Familia:	Solanaceae
Género:	Solanum
Especie:	<i>Solanum lycopersicum</i>

2. Características Generales

El tomate es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual. Es una planta mesófila pues requiere condiciones medias de humedad. El tronco es de tipo herbáceo y tanto éste como las ramas están cubiertas por una densa cantidad de pelos epidérmicos (Jagatheeswari, 2014). El crecimiento puede ser de tipo rastrero, semierecto o erecto y está limitado en variedades determinadas, e ilimitado en variedades indeterminadas, pudiendo llegar en estas últimas hasta 10 metros en un año. En las plantas con crecimiento determinado la primera inflorescencia aparece relativamente pronto, hay tendencia a que existan no más de dos hojas nodales entre racimos y el tallo principal termina en una inflorescencia. La ramificación es generalmente simpodial, con lo que los ejes sucesivos se desarrollan a partir de la yema axilar del eje precedente y la yema terminal da lugar a la inflorescencia o a ramas abortivas (Chamarro, 2001). Las raíces son pivotantes. Las hojas son alternadas, compuestas imparipinnadas, con foliolos que son peciolados y lobulados con bordes dentados recubiertos de pelos glandulares. La inflorescencia es del tipo racimo corto, con un número variable de flores. Las flores son pediceladas, bisexuales, pequeñas, de color amarillo, hipóginas, actinomorfas (Figura 1). El cáliz posee 5 lóbulos, 5 o más sépalos persistentes semifusionados lateralmente por la base. La corola posee 5 o más pétalos amarillos semifusionados dispuestos de forma helicoidal y de igual número de estambres que se alternan con los pétalos. El androceo está compuesto de 5 o más estambres epipétalos fusionados a la corola por sus filamentos y posee anteras largas de color amarillo, que forman un tubo en forma de botella en cuyo interior queda encerrado el estilo. El gineceo es bi o multilocular, el ovario es supero con placentación axilar. La inflorescencia es de tipo racimo. El fruto es generalmente de color rojo de tipo carnoso, del tipo baya con muchas semillas (Jagatheeswari, 2014).

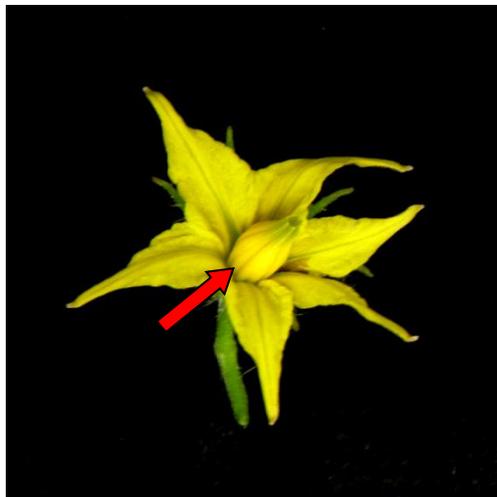


Figura 1: Flor de tomate (*Solanum lycopersium* cv. Moneymaker). Las anteras se fusionan formando el cono estaminal con los extremos unidos formando un cuello (ver flecha roja), el estigma queda por dentro del cono.

3. Morfología del fruto

En un fruto adulto de tomate se puede encontrar básicamente las siguientes estructuras: el pericarpio, el tejido locular, la placenta y las semillas (Figura 2). Anatómicamente el fruto puede ser estudiado a dos niveles: un primer nivel macroscópico tisular y un segundo nivel macroscópico celular. El estudio de estos dos niveles permitiría entender las propiedades biomecánicas del fruto (Li *et al.*, 2011) A nivel tisular, el fruto principalmente consiste de

pericarpio y semillas, y el pericarpio está compuesto principalmente de 3 capas: exocarpo, mesocarpo y endocarpo. En un mismo fruto estas capas siempre presentan diferencias obvias en grosor y en composición química. El exocarpo que es la capa más externa está compuesta de una cutícula, epidermis y una o dos capas de parénquima subepidermal. Las células del parénquima del exocarpo son ricas en cloroplastos en estadios inmaduros, conforme se va avanzando hacia la madurez estos se convierten en cromoplastos ricos en carotenoides. El mesocarpo es la capa media y está compuesta de parénquima en el que las células contienen compuestos orgánicos e inorgánicos que le permiten constituir la porción comestible. El mesocarpo del tomate es carnoso y rico en jugo. El endocarpo es la capa interna que está directamente en contacto con las semillas (Cutler *et al.*, 2008)

A un nivel celular, el fruto está compuesto de células que sufren diferentes procesos, tales como: división celular, diferenciación celular, endoreduplicación, expansión celular, transformaciones metabólicas y acumulación de vacuolas. (Génard *et al.*, 2007).



Figura 2: Corte transversal de un fruto de tomate. PE: Pericarpio, PL: Placenta, C: Columela, L: Lóculo, S: semilla rodeada de tejido locular.

4. Desarrollo y cuajado del fruto

La fertilización (estadio 0) es el proceso que inicia el desarrollo del fruto de tomate, también conocido como cuajado. El término cuajado se entiende por la reanudación del crecimiento del ovario de la flor, en el cual se pasa de un estado estático a uno de rápido crecimiento, y depende de que la polinización y fecundación de los óvulos sea exitosa (Gillaspy *et al.*, 1993). El estadio 1, ocurre inmediatamente después de la fertilización y se caracteriza por numerosas divisiones celulares, lo cual aumenta el número de células en el pericarpio. El estadio 2 comienza a las dos semanas después de la polinización con una caída de la tasa de división, en este estadio aumenta el peso significativamente y coincide con la endoreduplicación (Bergervoet *et al.*, 1996) y culmina cuando el fruto tiene aproximadamente 2 cm de diámetro. El tercer estadio se conoce como “*mature green*” (MG) o verde-maduro y es aquí donde el fruto alcanza su tamaño final. (Czerednik *et al.*, 2012). Al cabo de dos días de haber llegado al estado MG el fruto sufre una gran reorganización metabólica que marca el inicio del proceso de maduración (Ho and Hewitt, 1986). En el proceso de maduración se pueden distinguir dos fases principales: “*breaker*” (BR) o anaranjado-pintón y *ripening* (RR) o rojo-maduro. En la fase BR se da la conversión de los cloroplastos en cromoplastos, lo cual se evidencia por el cambio de color de amarillo a anaranjado debido a la acumulación de carotenoides y degradación de la clorofila (Figura 3). Al final del proceso de maduración la zona de abscisión se forma en el pedicelo (Mao *et al.*, 2000), el cual permite que el fruto caiga una vez que ha madurado. Las células de la zona de abscisión

son pequeñas y carecen de vacuolas. En el tomate la formación e la zona de abscisión es controlada por JOINTLESS un factor de transcripción MAD-box (Mao *et al.*, 2000)

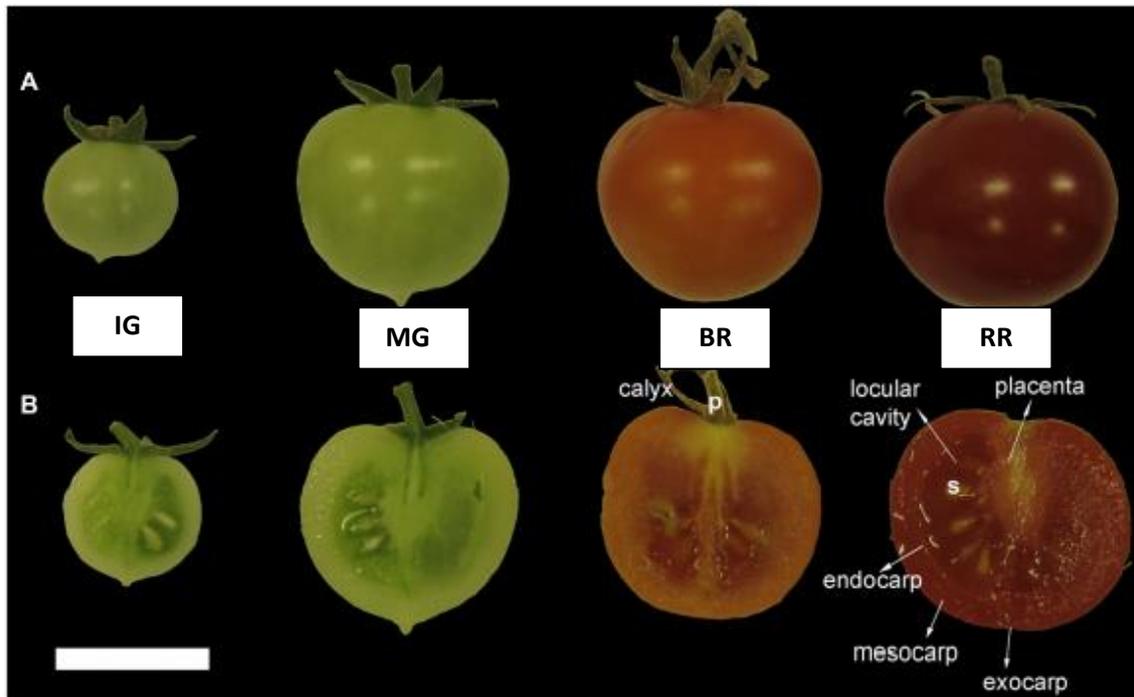


Figura 3: Diferentes estadios del desarrollo del tomate y detalles anatómicos. (Adaptado de Pesaresi *et al.*, 2014)
(A) El desarrollo del tomate puede ser dividido en diferentes estadios IG: verde-inmaduro MG: verde-maduro, BR: "breaker" o anaranjado-pinton, RR: "ripening" o rojo-maduro. (B) Sección transversal del fruto en los diferentes estadios. p: pedicelo, s: semillas.

5. Control hormonal de la fructificación

Diversas investigaciones han demostrado que las hormonas que desempeñan un papel fundamental en el proceso de cuajado y desarrollo del fruto con las auxinas y las giberelinas (GAs) sin descartar la participación de otras hormonas (Mapelli *et al.*, 1978; Fos *et al.*, 2000; Fos *et al.* 2001), y que pueden actuar solas o combinadas dependiendo del proceso que regulan. El primer paso en la formación del fruto se ha atribuido tradicionalmente a tres hormonas: auxina y/o giberelinas y/o citoquininas (Mariotti, 2011). Por ejemplo en el tomate estudios recientes revelan la presencia de un gradiente de ácido indolacético (IAA) de adentro hacia afuera durante la fase de expansión celular, lo cual sugiere que las auxinas presentes en la capa externa de las células placentarias promueven la expansión de la placenta para rodear las semillas y llenar la cavidad locular (Patison y Cattala, 2012). Otros estudios indican que la aplicación combinada de estas hormonas induce el desarrollo del fruto en ausencia de fertilización (Mariotti *et al.*, 2011). Por otra parte los genes de respuesta de auxinas y giberelinas se encuentran regulados positivamente después de la polinización (Vriezen *et al.*, 2008). Algunos estudios demuestran que la biosíntesis de GA es regulada por auxinas (Ross *et al.*, 2001; de Jong *et al.*, 2011), por lo que es posible que la polinización induzca la señalización de auxinas y que en consecuencia se induzca la biosíntesis de giberelinas bioactivas y así se estimule el cuajado del fruto (Ozga y Reinecke, 2003; Serrani *et al.*, 2008). Un factor clave en la interacción auxina-giberelina, es el factor de respuesta a auxina (ARF), *SIARF7*, el cual si está mutado produce el desarrollo de frutos partenocárpicos. Estos frutos tienen un pericarpio delgado con células alargadas que tienen una apariencia similar a los frutos inducidos con giberelina. Los análisis moleculares revelan que

SIARF7 es parcialmente controlado por señales de auxinas y giberelina (de Jong *et al.*, 2009, 2011). Esta ruta ha sido caracterizada en mutantes de tomate *procera*, los cuales tienen una respuesta constitutiva a giberelina, lo que indica que la activación de la ruta de señalización de giberelina después de la fertilización también es controlada por la expresión de *SIARF7* (Carrera *et al.*, 2012).

Es bien conocido que las citoquininas promueven la proliferación celular en el meristemo apical e interactúan con las auxinas (Murray *et al.*, 2012) y probablemente funcionan de manera similar en el desarrollo del gineceo (Bartrina *et al.*, 2011). Un reciente estudio en *Arabidopsis* muestra que las citoquininas tienen al menos dos roles en el desarrollo del fruto: un rol temprano en el desarrollo del gineceo y un rol tardío en el desarrollo de las valvas marginales del fruto (Marsch-Martínez *et al.*, 2012).

Las evidencias indican que existe un incremento transitorio del etileno en los pistilos del tomate después de la polinización, el cual eventualmente decrece. Los cambios asociados al etileno se reflejan en los niveles de mRNA de los genes relacionados a etileno, tales como ACC, ACO1 y EIL3. Muchos genes codificantes de factores de respuesta a etileno (ERFs) muestran cambios en la transición de flor a fruto (Vriezen *et al.*, 2008, Pascual *et al.*, 2009).

El ácido abscísico (ABA) y las poliaminas (PAs) también están implicadas en el desarrollo del fruto pero el conocimiento acerca del modo de acción aún es incompleto (Nitsch *et al.*, 2009). Los niveles de ABA se reducen durante el desarrollo del fruto y esta reducción está asociada con la reducción de la expresión de los genes codificantes de las enzimas de biosíntesis de ABA, después de la polinización (Vriezen *et al.*, 2008)

Finalmente, otras hormonas como los brasinosteroides (BRs) también tendrían un rol en el desarrollo del fruto. Por ejemplo en el pepino la aplicación exógena de brasinosteroides induce la formación de frutos partenocárpicos, mediante la inducción de la división celular, mientras que los inhibidores de BRs impiden la capacidad natural de formar este tipo de frutos en pepinos partenocárpicos (Fu *et al.*, 2008), aunque esto no ocurre en tomate (Marti *et al.*, 2007).

6. Factores de transcripción implicados en el desarrollo del fruto

En general los estudios del desarrollo del fruto se han centrado principalmente en el proceso de maduración, sin embargo en los últimos años ha habido un interés creciente por realizar estudios acerca de la regulación transcripcional del proceso de desarrollo temprano del ovario y del cuajado del fruto, dichos estudios han permitido identificar a los diferentes factores de transcripción que regulan las etapas de identidad floral, fructificación y maduración (Figura 4).

Durante el desarrollo de la flor, el meristemo apical produce típicamente los primordios de los cuatro verticilos florales, de los cuales el cuarto verticilo interno, el carpelo, se fusiona para formar el ovario, con óvulos que se originan en los márgenes del carpelo. La identidad y el tamaño del ovario, y, como consecuencia de ello al menos parcialmente el tamaño del fruto y su posterior desarrollo o maduración estaría determinado en una etapa muy temprana, y se han encontrado que son controlados por factores de transcripción (Karlova *et al.*, 2014)

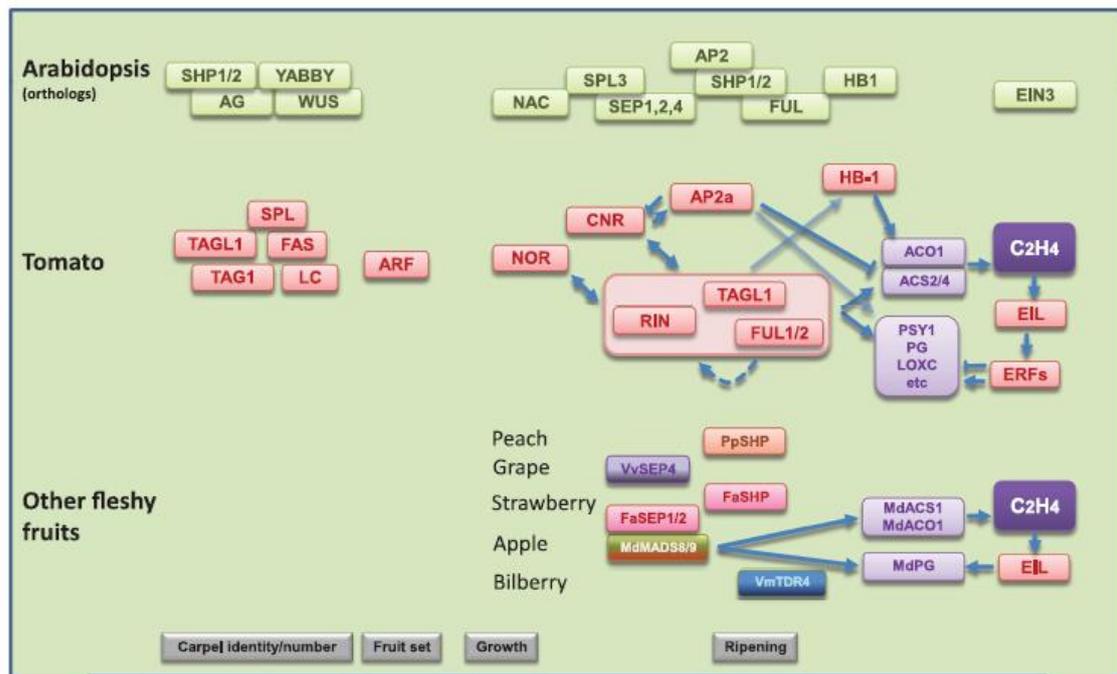


Figura 4: Visión esquemática de los reguladores transcripcionales en el desarrollo y maduración de los frutos carnosos. En la parte central se detallan los factores de transcripción en tomate. Las cabezas de flecha representan interacciones positivas y las cabezas de barra interacciones negativas. Los genes en púrpura están implicados en la regulación de la síntesis de etileno, carotenoides y producción del sabor. RIN, TAGL1 y FUL 1/2 probablemente funcionan como complejos de posición variable. De acuerdo con los objetivos de este trabajo, en el texto solo se explicarán aquellos factores de transcripción relacionados con los estadios tempranos del desarrollo del fruto (carpel identity/number, fruit set) (Karlova *et al.*, 2014).

Uno de los mayores determinantes en la domesticación y selección del tamaño de fruto en el tomate ha sido el incremento del número de lóculos (Cong *et al.*, 2008). Dos genes subyacentes a QTLs codifican factores de transcripción y determinan el incremento en el número de lóculos mediante el incremento en el número de carpelos que forman un ovario simple (Lippman y Tanksley, 2001). El gen con el efecto más fuerte *FASCIATED* (*FAS*) codifica a YABBY, y se expresa, aunque no exclusivamente, en primordios carpelares (Cong *et al.*, 2008). *FAS* es un ortólogo de YABBY 2 en Arabidopsis (Huang *et al.*, 2013), el cual está implicado en la polaridad de órgano. La mutación *fas* causa una baja expresión del gen y gran número de lóculos sin que ocurran cambios proteicos (Cong *et al.*, 2008). El segundo QTL, *locus number* (*lc*) es controlado por dos polimorfismos de nucleótidos simples cerca al ortólogo en tomate de *WUSCHELL* (*WUS*). Sin embargo la identificación de *WUS* como el gen causal subyacente al QTL no está del todo establecido (Muños *et al.*, 2011)

La identidad de órgano floral es determinada por factores de transcripción tipo MADS-box de acuerdo al modelo universal ABC o variaciones del mismo (Smaczniak *et al.*, 2012). Siguiendo este modelo, la identidad del carpelo es determinada por los genes tipo *AGAMOUS* (*AG*) y *SHATTERPROF 1/2* (*SHP1* y *SHP2*) en Arabidopsis (Favaro *et al.*, 2003). En tomate hay dos genes tipo *AGAMOUS*: *TGAL1* y *TAG1*. Ensayos de silenciamiento o "Knock down" del gen *TAG1* por RNA de interferencia resulta en estambres defectuosos y pérdida de la determinación dando lugar a flores anidadas en flores (Pnueli *et al.*, 1994) o en un fenotipo de frutos anidados (Pan *et al.*, 2010). El silenciamiento de *TAGL1* influye en la maduración del fruto sin afectar la especificidad de órgano floral (Vrebalov *et al.*, 2009, Giménez *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2010). En

particular, los frutos *tagl1* se caracterizan por tener un pericarpio delgado, la reducción de la firmeza en el estadio *breaker* y la permanencia de los plastidios en las células del colénquima; consecuentemente los frutos *tagl1* acumulan más clorofila y luteína que los frutos silvestres (Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009).

El patrón, la determinación y el desarrollo temprano del fruto de tomate parece estar regulado por uno o más factores de transcripción tipo microRNA156-targeted SQUAMOSA promoter binding protein-like (SPL/SBP), pues el silenciamiento de la expresión de dichos factores a través de la expresión ectópica de MIR156b producen carpelos extra y estructuras parecidas a frutos que crecen en el extremo estilar del fruto. Curiosamente, dos genes asociados con el mantenimiento meristemático y la expresión de nuevos órganos, tales como *LeT6/TKN2* (un gen clase I similar a *KNOX*) y *GLOBET* (un gen similar a *NAM/CUC*), fueron inducidos en el desarrollo de los ovarios de plantas transgénicas que sobreexpresan microRNA156 (156-OE), así como también en el ovario del mutante natural *Mouse ear (Me)* y los frutos mostraron carpelos extra también. Por el contrario la expresión de los genes MADS-box *MACROCALIX (MC)* y *FUL1/TDR4* y *FALSIFLORA*, el ortólogo de *LEAFY*, fue reprimida en el desarrollo de ovarios de plantas 156-OE, lo cual sugiere similitudes con *Arabidopsis* en este punto de la ruta microRNA156/SPL pero con distintas consecuencias funcionales en el desarrollo reproductivo. En conjunto, estas observaciones sugieren que el microRNA156 está implicado en el mantenimiento del estado meristemático de los tejido ováricos, de este modo controla las etapas iniciales de la determinación y el desarrollo de los frutos carnosos (Silva *et al.*, 2014)

Recientemente, la mutación de inserción semidominante Arlequin (*Alq*) ha sido mapeada y se encontró que corresponde a una forma alterada del gen *TAGL1* (Giménez *et al.*, 2010). En las plantas *Alq* los sépalos se transforman en frutos, los cuales pasan por un proceso de maduración al igual que el fruto originado por los pistilos. Así este mutante fenocopia líneas transgénicas que sobreexpresan *TAGL1* (Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009; Giménez *et al.*, 2010).

Los factores de transcripción de respuesta a auxinas (ARFs) también están implicados en el desarrollo del fruto. Por ejemplo, el factor de transcripción de respuesta a auxina en *Arabidopsis thaliana* (*AtARF8*) y su homólogo en tomate *ARF7* están implicados en el inicio de la fructificación. Los mutantes *atarf8* desarrollan frutos partenocárpicos mientras que plantas de tomate que expresan alelos *arf8-4* desarrollan frutos con una cantidad menor de semillas (Wang *et al.*, 2005). La partenocarpia también se ha inducido por silenciamiento vía RNA de interferencia de *ARF7* (de Jong *et al.*, 2009).

7. Factores de transcripción tipo MYB

Una característica común de las proteínas tipo MYB es la presencia de un dominio de unión al DNA cerca al extremo N-terminal, el cual se encuentra conservado. Un dominio MYB mínimo consiste en dos regiones de cerca de 50 aminoácidos de longitud, cada región es capaz de formar tres hélices alfa (H1, H2 y H3) y así unirse al DNA. La mayoría de las proteínas MYB presentan tres secuencias repetidas imperfectas (R1, R2 y R3), aunque también se han identificado proteínas con 4 o más segmentos repetidos (Figura 5)

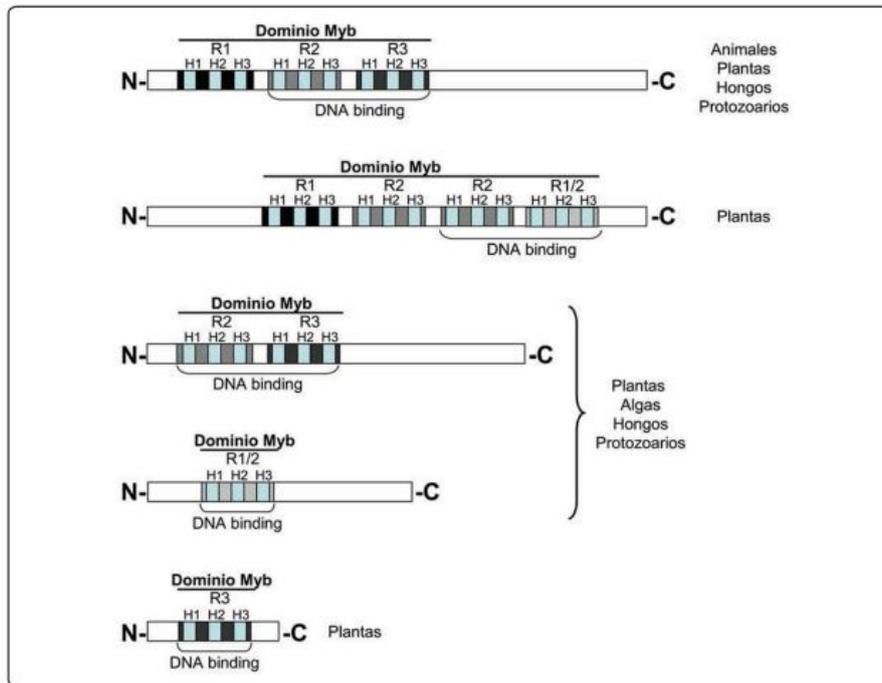


Figura 5: Clases de proteínas MYB. Se muestra las diferentes clases de proteínas MYB presentes en los eucariontes dependiendo del número de secuencias repetidas (R1, R2 y R3). Los corchetes indican el dominio de unión al DNA y las letras H1, H2 y H3 indican la estructura secundaria tipo hélice. (Arratia y Aguirre, 2013)

Las secuencias repetidas imperfectas contienen tres residuos de triptófano espaciados regularmente, estos constituyen un centro hidrofóbico en el plegamiento tridimensional hélice-giro-hélice de cada región repetida. Las secuencias repetidas de la primera proteína MYB descrita (c-Myb) son nombradas como R1, R2 y R3, es así que los segmentos repetidos de otras proteínas MYB se nombran de acuerdo a su similitud con estas secuencias. Debido a la poca similitud en la secuencia fuera del dominio MYB, las proteínas MYB se han clasificado de acuerdo al número de secuencias repetidas adyacentes: MYB R1R2R3 (MYB 3R), MYB R2R3, MYB R (o relacionados a MYB) y MYB R2R2R2R1/2 (MYB R4). Sólo las secuencias R2 y R3 se requieren para la unión al DNA en forma específica (Revisado por Arratia y Aguirre 2013).

8. Proteínas MYB en plantas

La familia de proteínas MYB es una de las clases de factores de transcripción más numerosa en plantas. En las plantas se encuentran las cuatro clases de proteínas Myb descritas, siendo la familia Myb R2R3 la más abundante.

Se han descrito varias funciones bien definidas para los factores de transcripción Myb en las plantas tanto en la regulación del crecimiento vegetativo como en el reproductivo: control del metabolismo primario y secundario (biosíntesis de flavonoides y antocianinas), el ciclo celular (regulan la expresión de la ciclina B), regulan la formación de tricomas y pelos en la raíz, tienen papeles en la embriogénesis. En cuanto a los procesos relacionados con el desarrollo reproductivo, controlan la diferenciación de la cubierta externa de la semilla, la forma de las células epidermales de los pétalos, el desarrollo de la inflorescencia temprana y la germinación de las semillas, la floración (Revisado por Arratia y Aguirre, 2013)

9. El tomate como sistema modelo para estudios de desarrollo

La especie modelo por excelencia para estudios en las plantas ha sido *Arabidopsis thaliana*, sin embargo esta especie produce frutos secos y no es una especie de interés agronómico. El tomate es una planta modelo ideal para el estudio del desarrollo de frutos carnosos y maduración de frutos climatéricos. Actualmente se cuenta con el genoma secuenciado y disponible de *Solanum lycopersicum* cv. "Heinz 1706" (Tomato Genome Consortium 2012, Aoki *et al.*, 2013). El tamaño predicho del genoma diploide es de aproximadamente 900 Mb distribuidas en 12 cromosomas, más del 75% es heterocromatina en gran medida desprovista de genes. Alrededor de 33000 genes se han predicho y en torno a 5000 genes son expresados diferencialmente en el fruto (Tikunov *et al.*, 2013). Algunas de las características que hacen del tomate una planta modelo para estudios básicos y aplicados son: posibilidad de crecer bajo diferentes condiciones de cultivo, su ciclo de vida relativamente corto, su habilidad para producir semillas, genoma pequeño, carencia de duplicación génica, alta autopolinización y homocigosidad, facilidad en el control de la polinización y la hibridación, habilidad de propagarse asexualmente por injerto y posibilidad de regenerar plantas enteras a partir de diferentes explantes (Bai y Lindhout, 2007; The Tomato Genome Consortium 2012). Entre los genotipos existentes, el cultivar Micro-Tom es considerado un modelo excelente por sus características únicas antes mencionadas (Kobayashi, 2013). Adicionalmente, en contraste con otros organismos modelos como *Arabidopsis* o arroz tiene muchas otras características interesantes como el crecimiento simpodial y es la única planta modelo con hojas compuestas. Además existe una gran colección de mutantes algunos espontáneos otros inducidos por radiación o químicamente que están disponibles en el Tomato Genetic Resource Center (Lozano *et al.*, 2009), plataformas genómicas mundiales (<https://solgenomics.net>), otras como LycoTill y la base de datos japonesas de mutantes de la variedad Micro-Tom, TOMATOMA (Minoia *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2011). El genoma del tomate fue publicado en Nature un 31 de mayo del 2012, en el cual trabajaron un equipo multinacional de científicos de 14 países. Todas estas razones convierten al tomate en una excelente planta modelo para el estudio del desarrollo de frutos carnosos.

B. ANTECEDENTES

Con la finalidad de estudiar el proceso de cuajado y el desarrollo del fruto de tomate, en nuestro laboratorio, se llevó a cabo un análisis transcriptómico global del desarrollo autónomo del ovario en las plantas transgénicas partenocárpicas de tomate PsEND1::barnasa; en las que el gen citotóxico barnasa es dirigido específicamente a las anteras por el promotor del gen PsEND1 de guisante (Roque *et al.*, 2007). Las plantas de tomate transformadas con esta construcción producen flores androestériles y los ovarios de estas plantas se desarrollan dando lugar a frutos sin semillas (partenocárpicos) (Medina *et al.*, 2013). En dicho análisis transcriptómico se utilizaron micromatrices de oligos TOM2 (<http://ted.bti.cornell.edu/cgibin/TFGD/array/home.cgi>) y se evaluaron diferentes estadios de la planta comprendidos entre 5-7 días antes de la antesis y 2-4 días después de la antesis comparando con plantas silvestres del cultivar Micro-Tom. Los resultados obtenidos mostraron que la mayor actividad transcripcional se da en los estadios 1 (6 días antes de la antesis) y 4 (antesis), donde se evidencia un gran número de genes inducidos y reprimidos. Los cambios transcripcionales asociados a procesos de regulación fueron abundantes y corresponden principalmente a factores de transcripción y a cambios en la modificación y degradación de proteínas. Con base en los resultados del “microarray” se seleccionó un grupo de genes que muestran homología con factores de transcripción tipo MYB (16 unigenes). La expresión de estos genes presenta cambios significativos durante en desarrollo del ovario en las plantas transgénicas (Medina, Tesis doctoral 2010).

Como una primera aproximación del estudio funcional de estos genes, se realizaron experimentos de silenciamiento transitorio mediado por virus en tomates del cultivar Micro-Tom usando la técnica llamada VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*). Entre los genes analizados, se evidenció que bajos niveles del gen *SIMYB* tienen como consecuencia una reducción en la formación de frutos y la formación de las semillas.

Mediante un análisis *in silico* del gen *SIMYB* se pudo ver que incluye una secuencia codificante de 588 pb en tres exones (133 pb, 130 pb y 325 pb respectivamente) y 2 intrones (292 pb y 2431pb respectivamente de 3' a 5') flanqueado por una región no traducida 5' (5' UTR) de 96 pb y una región no traducida 3' (3' UTR) de 223 pb. La secuencia de proteína que se dedujo era del tipo MYB R2R3 y se estimó un peso molecular de 22.42 kDa. Asimismo se identificó la presencia de residuos de triptófano e isoleucina al interior de cada dominio MYB (Hassanien, TFM 2013).

Además mediante el empleo de experimentos de fusión de la proteína codificada por el gen *SIMYB* a la proteína fluorescente GFP y agroinfiltración de hojas de *Nicotiana bentamiana* se dedujo su localización nuclear y se concluyó que *SIMYB* podría actuar como factor de transcripción. Así mismo, mediante el estudio de líneas 35S::SIMYB y RNAi::SIMYB se propuso que este gen podría estar involucrado en el desarrollo de flores y cuajado del fruto, y que tendría un rol relevante en la formación de semilla. Finalmente mediante ensayos de qRT-PCR se ha visto que el gen *SIMYB* en plantas silvestres de tomate cv. Micro-Tom se expresa exclusivamente en tejido floral alcanzando un pico de máxima expresión en antesis, siendo la expresión más elevada en estambres, respecto a pistilos, sépalos y pétalos, (Figura 6, Hassanien, TFM 2013). Estos resultados nos plantean como siguiente paso estudiar el patrón espacio-temporal del gen *SIMYB* en el desarrollo del fruto de tomate.

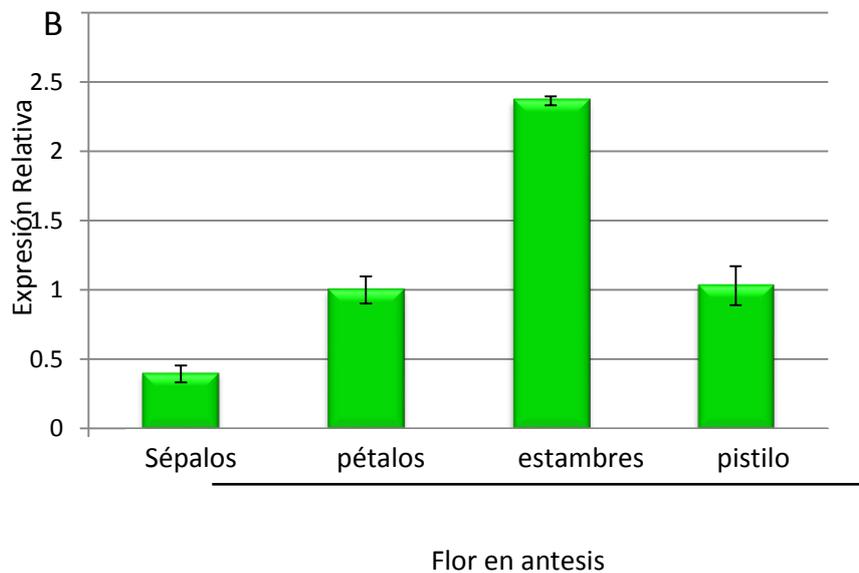
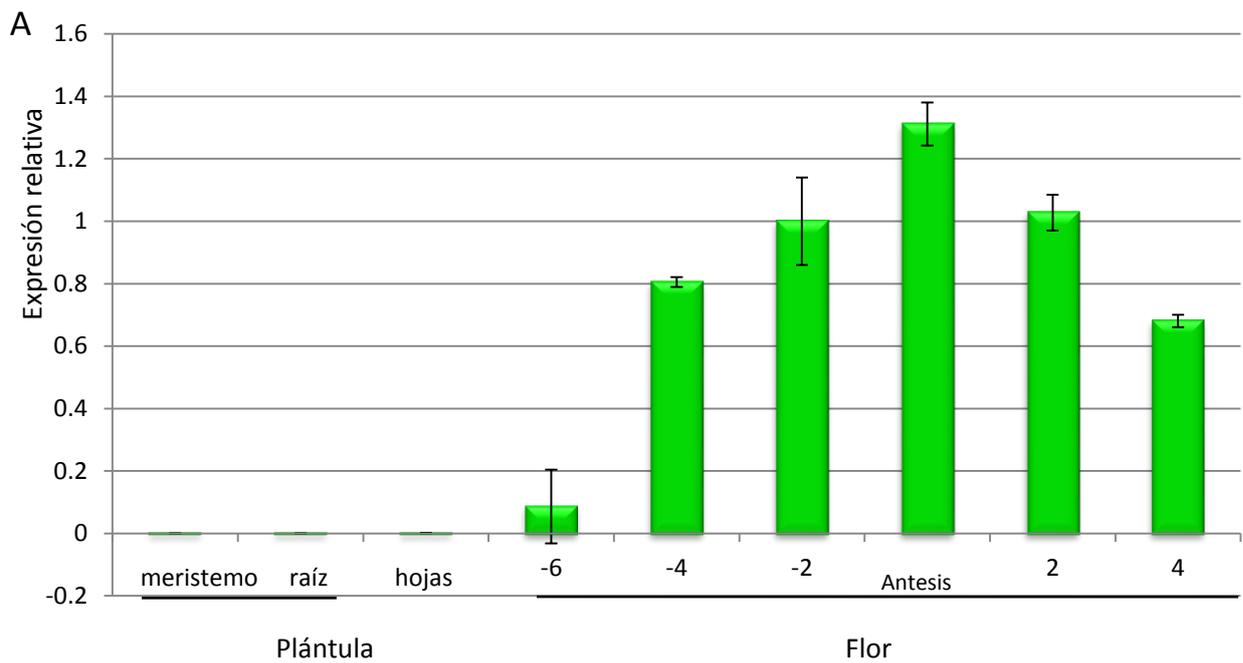


Figure 6. Expresión relativa del gen *SIMYB* en tomate silvestre cv. *Micro-Tom*. A. Niveles de transcripción en meristemo apical y raíces de plántulas de 7 días, hojas de plantas adultas, flores de seis días, cuatro y dos días antes de la antesis. Los niveles de expresión fueron relativos a la expresión en flores de dos días antes de la antesis (-2). B. Expresión a nivel de órganos florales en flores en antesis. Los valores son relativos a la expresión en pétalos. El nivel de la expresión génica fue cuantificado por qRT-PCR usando primers específicos y el gen endógeno *SIACT8* como normalizador (Adaptado de Hassanien, TFM 2013).

II. OBJETIVOS

En este trabajo se pretende determinar el patrón de expresión tisular del gen *SIMYB* durante el desarrollo reproductivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener líneas deladoras pSIMYB::GUS en tomate para estudiar del patrón de expresión espacio-temporal del gen.
- Obtener líneas transgénicas pSIMYB::GUS de *Arabidopsis thaliana* para evaluar la conservación del patrón de expresión espacio temporal del gen foráneo *SIMYB* en esta especie.
- Obtener el patrón tisular *in situ* utilizando cortes histológicos y ribosondas específicas en tomate.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIAL VEGETAL

En este trabajo se utilizaron plantas de tomate pertenecientes al cultivar 'Moneymaker', una variedad de crecimiento indeterminado que produce frutos de tamaño mediano, redondos y rojos, los cuales han sido utilizados extensivamente en la literatura para estudios de desarrollo del fruto, maduración, fisiología y fisiopatología del tomate. Para este cultivar existe una fuente de recursos genéticos disponibles tales como una colección de mutantes EMS y una plataforma TILLING (<http://www-urgv.versailles.inra.fr/tilling/tomato.htm>).

Se utilizaron plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* de ecotipo Columbia.

1. Condiciones de cultivo

1.1 Condiciones de cultivo de *Solanum lycopersicum*

Las plantas fueron cultivadas en invernadero en macetas de 17 cm de diámetro. Como sustrato se utilizó fibra de coco y el riego se realizó dos veces al día con solución nutritiva (Tabla 1), colocando 2 goteros por maceta para el fertirriego. La temperatura de cultivo fue de 24 ± 2 °C durante el día y 20 ± 2 °C durante la noche. La humedad relativa diurna osciló entre 45-65% y la nocturna entre 75-90%. La luz natural se suplementó con luz artificial mediante lámparas de vapor de mercurio para mantener un fotoperiodo de día largo.

Composición de la solución nutritiva	
Compuesto	Dosis (g/L)
PO ₄ H ₃	0,15
Ca(NO ₃) ₂	0,82
NO ₃ K	0,2
SO ₄ K ₂	0,35
SO ₄ Mg	0,24
BMX (Micronutrientes)	0,1

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

1.2 Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en alveolos y macetas

Las plantas de *Arabidopsis* se cultivaron en fitotrones bajo condiciones de crecimiento controladas de fotoperiodo y temperatura. La temperatura fue de 21°C y la iluminación procedía de tubos fluorescentes de luz blanca fría con una intensidad de 150 μ Em-2s-2 (Sylvania Standard F58W/133-T8). Las plantas se cultivaron bajo condiciones de fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Las semillas fueron sembradas en alveolos o en macetas dependiendo del posterior uso de las plantas generadas. Las semillas se sembraron en alveolos de plástico de 6.5 x 6.5 x 5 cm en una mezcla de turba: perlita: vermiculita (1:1:1). Se colocaron en bandejas dentro de cámaras de cultivo y se regaron por inmersión con solución de Hoagland n° 1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966). Tras la siembra, las bandejas se cubrieron con plástico para mantener la humedad y evitar contaminaciones con otras semillas procedentes de plantas próximas. Se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante 3 días a fin de sincronizar la germinación y al cabo de esos días se pasaron a cabinas. Al aparecer el primer par de hojas aproximadamente o ver condensación en el plástico que las recubría, se agujereó el mismo en distintos puntos de

la bandeja que fueron incrementándose hasta que se eliminó el plástico por completo al cabo de tres días.

La siembra en macetas se llevó a cabo en macetas de plástico de 11 cm de diámetro y se realizó el mismo proceso que para los alveolos.

1.3 Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en cajas Petri

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis* en cajas Petri se realizó en cabinas con temperatura constante de 25°C bajo condiciones de día largo. La luz fue suministrada por tubos fluorescentes con una intensidad de 90 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-2}$. Las semillas se esterilizaron por vapores de HCl, mediante el uso de una cámara desecante y en cámara de flujo laminar. Una pequeña cantidad de semillas se colocaron en tubos eppendorf y se dejó con las tapas abiertas, estos se colocaron en una gradilla dentro de la cámara desecante en la cual había también un frasco que contenía 100 ml de lejía. Se agregó 3 ml de HCl concentrado en el frasco de lejía e inmediatamente se cerró la cámara desecante para que los vapores de HCl entren en contacto con las semillas por un tiempo máximo de 4 horas. Para la selección de transformantes primarios las semillas esterilizadas se repartieron uniformemente en placas Petri de 15 cm de diámetro que contenían medio de germinación (2,2g de sales MS (Duchefa), 20 g/l sacarosa, 0.1 g/l MES pH 5.9, 0.6% de agar) suplementado con kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ y timentina 100 $\mu\text{g/ml}$. Las cajas con las semillas se almacenaron durante 3 días a 4°C de oscuridad tras los cuales se trasladaron a una cabina de cultivo *in vitro*. Al cabo de 7-10 días de la siembra los transformantes que se distinguían por su color verde y raíz elongada, se trasplantaron con ayuda de una pinza a alvéolos de plástico en condiciones de invernadero.

B. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL PARA MICROSCOPIA

1. Fijación del tejido vegetal

Los botones florales e inflorescencias se sumergieron en una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7, Tween 0.1% y Tritón X-100 (0.1%). Para ayudar a la penetración del fijador se realizaron 2 pulsos de vacío de 5 minutos cada uno, se cambió la solución por una fresca y se mantuvieron a 4°C durante 16 horas. Transcurrido el tiempo se procedió a deshidratar el tejido colocándolo en las siguientes soluciones 0.85% salina (NaCl) por 30 minutos, 50% Etanol/0.85% salina por 3 horas y 70% etanol/0.85% salina por 3 horas; todo en frío. Las muestras se mantuvieron en etanol 70% a 4°C hasta el momento de su inclusión en parafina.

2. Inclusión del tejido vegetal en parafina

El tejido se fijó siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Para la inclusión en parafina se utilizó el procesador de tejidos (Leica TP1020) el cual se programó siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa utilizado fue el siguiente: En primer lugar las muestras se continuaron deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol durante una hora cada una (70, 90, 90, 95, 95 y 100%). En la segunda concentración de etanol 95% las muestras se tiñeron con Eosina-Y al 0.2% por una hora. Posteriormente se sumergieron tres veces en Histoclear por una hora (National Diagnostics) y finalmente se transfirieron una primera vez por 1 hora 15 minutos y una segunda vez por 3 horas a parafina Paraplast® Plus (McCormick Scientific) fundida a 58 °C aplicando vacío. Tras la inclusión en parafina, mediante la estación de inclusión Leica EG1150H, las muestras se colocaron en moldes de aluminio con parafina líquida, se cubrieron con un soporte plástico y se dejaron solidificar a 4 °C. Posteriormente se realizaron los cortes histológicos de 8 o 12 µm de espesor utilizando un Microm HM330, y luego se colocaron sobre portaobjetos tratados con poly-lisina.

3. Microscopía óptica

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

C. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla 2

Cepa	Microorganismo	Método de transformación	Temperatura de crecimiento
DH10B	<i>Escherichia coli</i>	Electroporación	37°C
LBA4404	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Electroporación	28°C
C58C1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Electroporación	28°C

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas

1. Transformación de cepas bacterianas

Para la transformación de plásmido en cepas bacterianas se utilizó el método de electroporación. Se tomó 0,5 µl de DNA plasmídico purificado o "miniprep" y se mezcló con una alícuota de 50 µl de células competentes. Esta mezcla se colocó en la cubeta de electroporación, la cual estaba sumergida en hielo; se utilizó un pulso de 200Ω, 25 µF y 1,8 kV para *E. coli* y 400Ω, 25 µF y 1,8 kV para *A. tumefaciens*.

Posteriormente se colocó la muestra electroporada en cultivo de agitación a 37°C por una hora para *E. coli* y 28°C durante tres horas para *A. tumefaciens*, para después plaquearla en medio Luria Bertani (LB) sólido suplementado con antibióticos para seleccionar las células transformadas.

Antibiótico	Concentración (ug/µL)	
	E. coli	A. tumefaciens
Espectinomycin	100	100
Kanamycin	50	50
Rifampicin	-	20

Tabla 3. Antibióticos usados para la selección de las colonias bacterianas recombinantes.

D. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

1. Extracción de DNA plasmídico

Se partió de 3 ml de cultivo crecidos durante una noche en LB suplementado con antibiótico, posteriormente se utilizó el protocolo establecido de extracción y purificación de DNA plasmídico del sistema E.N.Z.A Plasmid DNA Mini Kit I de Omega Bio-Tec, Inc. La cuantificación se realizó mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

2. Extracción de DNA genómico

Se tomaron 300 mg de hojas jóvenes, estas se maceraron en un tampón de extracción (0.2 M Tris-HCl pH 9.0, 0.4 M LiCl, 25 mM EDTA, 1% v/v SDS). Tras una centrifugación de 5 min a 13.000 rpm, se tomó 350 µL del sobrenadante y se transfirieron a un tubo eppendorf que contenía 350 µL de isopropanol y la mezcla se centrifugó por 10 min. El sobrenadante se eliminó y el pellet se lavó dos veces con etanol al 70% (v/v). Después de dejarlo secar el pellet fue resuspendido en 200 µL de agua destilada.

3. Amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de los fragmentos de DNA se realizó a partir de 50 ng de DNA molde. Se utilizó dos enzimas polimerasas, la primera es una enzima más rápida por lo que requiere menos ciclos acuerdo a las siguientes reacciones:

Mezcla de reacción para la primera enzima: 12.5 µL de KAPA2G Fast Hot Star Ready Mix (2x), 1.35 µL (10 µM) de cada par de los oligonucleótidos específicos dependiendo del fragmento a amplificar (Ver tabla 4), en un volumen final de 25 µL.

Mezcla de reacción para la segunda enzima: se agregó 0.5 µL de dNTPs 10 µM, 2.5 µL de tampón de reacción 10X, 0.8 µL de MgCl₂ 50 mM y 1 unidad de DNA polimerasa (*Biotools*).

Las reacciones se desarrollaron en un termociclador Arktik Thermal Cycler de Thermo Scientific. Las condiciones para la kanamicina fueron un incubación inicial de 94 °C por 2 min; seguida de 28 ciclos de amplificación y una incubación final de extensión. En cada ciclo se primero se realizó una desnaturalización a 95 °C durante 15 s; luego un anillamiento de 15 s a la temperatura óptima de hibridación de los oligonucleótidos utilizados (T= 57) y una tercera etapa de 72 °C durante 30 s que corresponde a la extensión. Asimismo las condiciones para las demás reacciones fueron una incubación inicial de 94 °C durante 4 min; seguida de 35 ciclos de amplificación y una incubación final de extensión. En cada ciclo se desnaturalizó a 94 °C durante 30 seg; luego un anillamiento de 1s a 56 °C y una tercera etapa de extensión a 72° C durante 7 s.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Longitud	Tm(°C)	T (°C)	GC%	Amplición (pb)
SIMYB Dir	ATGGATAAAATATGCAACTCTCAAG	25	59	55	32	588
SIMYB Rev	ATCTCCATTAAGCAATTGCA	20	52	55	30	
SIMYB corto Dir	GAACGGATAACGAGATAAAA	20	52	55	35	290
SIMYB Rev	ATCTCCATTAAGCAATTGCA	20	52	55	30	
KAN Dir	GACAAGCCGTTTTACGTTTG	20	66	58	45	583
KAN Rev	GATACTTTCTCGGCAGGAG	19	68	58	53	
M13 Dir	GTA AACGACGGCCAGT	17	55	55	53	795
M13 Rev	AACAGCTATGACCATG	16	55	55	44	
GUS For 2	CGATAACGTGCTGATGGTGAC	22	64	56	55	894
GUS Rev	CATTGTTTGCCTCCCTGCTGCG	22	66	56	59	

Tm: temperatura de fusión estimada; T: temperatura de anillamiento

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de fragmentos.

E. TÉCNICA DE CLONACIÓN

La técnica utilizada en este trabajo fue la recombinación homologa Gateway (Invitrogen), dicha técnica se basa en las propiedades de recombinación específicas del bacteriófago lambda, el cual contiene sitios de recombinación bien caracterizados conocidos como att (site- specific *ATTachmnet*).

Los productos de PCR amplificados se clonaron en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO TA (pCR8; Invitrogen), el cual posee las secuencias de recombinación attL1 y attL2 y dos sitios EcoRI, que se encuentran flaqueando el fragmento de interés. Este vector está abierto y tiene un residuo de timina en cada uno de sus extremos el cual permite clonar productos de PCR eficientemente.

Posteriormente los clones que se obtuvieron se secuenciaron, para determinar la orientación del fragmento respecto al promotor T7 del vector. Una vez determinada la orientación del fragmento clonado, los fragmentos de orientación adecuada se incorporaron en los vectores de

destino del sistema Gateway que contienen dos lugares de recombinación attR1 y attR2 mediante una reacción de recombinación catalizada por la enzima Clonasa, donde el sitio attL1 reaccionó con el attR1 y el attL2 con el attR2.

1. Plásmidos utilizados

El plásmido de entrada pCR8 descrito en el apartado anterior posee un gen de resistencia a espectinomicina, el promotor T7 y los sitios M13. Como vectores destino, se utilizó el plásmido binario compatible con la tecnología Gateway, el vector pKGWFS7,0 (<https://gateway.psb.ugent.be/search>) que se utiliza para analizar promotores. Este vector confiere resistencia a espectinomicina en bacterias y resistencia a kanamicina en plantas.

Para la clonación de los fragmentos que se utilizaron en la hibridación *in situ* se utilizó también el vector pCR8.

2. Electroforesis en geles de agarosa y purificación de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8-1% (p/v) en tampón TBE 1X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2 mM; pH=8,0), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0.25% (p/v), azul de xilencianol 0.25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) hasta una concentración final 1X. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V durante el tiempo necesario. Además, al momento de preparar los geles se agregó bromuro de etidio 0.5 µg/ml para poder visualizar el DNA al exponerlos a la luz ultravioleta.

Para la purificación de los fragmentos de DNA, las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta y se cortaron con ayuda de una cuchilla. La purificación del DNA se llevó a cabo mediante el sistema GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit (EURX) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3. Digestión del DNA con enzimas de restricción

En tubos de 1,5 ml se agregó 5-10 U de la enzima/µg de DNA, cada reacción iba acompañada de su respectivo tampón según las especificaciones de la casa comercial. La incubación se realizó en un termobloque Thermomixer confort (Eppendorf) durante dos horas a 37 °C. Al finalizar la incubación la digestión se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

F. Hibridación *in situ*

1. Generación de sondas marcadas con digoxigenina

Las ribosondas se sintetizaron a partir de un fragmento de cDNA de 290 pb del gen *SIMYB* clonado en el vector pCR8. La amplificación de los fragmentos se realizó mediante PCR con oligonucleótidos M13 propios del vector (Ver tabla 4), posteriormente se purificaron a partir de un gel de agarosa 1% y se utilizaron como moldes para cada sonda. Se transcribió la sonda en “antisentido o negativo” respecto al promotor T7 del vector, y como control negativo frente a hibridaciones inespecíficas se generó una sonda “sentido o positiva”.

La reacción de transcripción *in vitro* se preparó de la siguiente manera: un volumen final de 20 µl que contenía 200 ng de molde de cDNA amplificado, 2µl de DIG RNA Labeling Mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM DIG-11-UTP. Roche), 2µl de inhibidor de

RNAsas (Protector RNase Inhibitor, Roche), 2 μ L de T7 RNA polimerasa y 2 μ L de 10X buffer, Roche. Esta reacción se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación cada sonda se trató con 1 μ L de DNasa I libre de RNasa (Roche®) durante 15 min a 37 °C. Para parar la reacción se adicionaron 2 μ L de EDTA 0.2 M, seguido de 1 μ L de tRNA de levadura (10 μ g/ μ l, Roche) y para precipitar la sonda 10 μ L de LiCl 1M y 75 μ L de etanol 100% y se almacenó a -20 °C toda la noche. Al día siguiente las sondas fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos, se lavaron en etanol 80% y una vez secas se resuspendieron en 50 μ L de agua desionizada estéril libre de RNAsas. Para la cuantificación de la sonda se utilizó 1 μ L y el resto se guardó en congelación a -20 °C hasta su uso.

2. Cuantificación de la sonda

Se realizó mediante la técnica de hibridación de ácidos nucleicos tipo “dot blot”. Se prepararon diluciones 1/25, 1/100 y 1/250 a partir de 1 μ L de sonda sintetizada. Luego 1 μ L de cada una de las diluciones se colocó en una membrana de nylon, la cual se seco y se fijó con luz ultravioleta. Un RNA marcado con digoxigenina de concentración conocida (Roche) se utilizó como control de cuantificación, para lo cual se prepararon las mismas diluciones y se colocaron en la misma membrana.

Se incubó la membrana durante 2 min en TBS 1X (Stock 10X 1M Tris-HCl, 4M NaCl, pH 7,5) luego se procedió a bloquear con Blocking Reagent (Roche) al 0.5% en TBS 1X durante 10 minutos. Luego la membrana se lavó en BSA 1% y tritón X-100 0.3% en TBS 1X durante 5 minutos y se incubó durante 20 minutos con el anticuerpo anti-Dioxigen-AP, Fab fragments (Roche) diluido en la misma solución a una concentración 1:3000. Para quitar las tasas del anticuerpo se lavó con la misma solución sin anticuerpo 2 veces durante 4 minutos cada una. Posteriormente se adicionó el tampón de detección (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 M MgCl₂, pH 9,5) y se reveló en 2.5 ml de tampón de detección 1X con sustrato (3,75 μ L de NTB (100 mg/ml) y 3,75 μ L de BCIP (50 mg/ml) de Roche) incubando por 12 minutos en oscuridad. Como paso final se enjuagó con agua destilada estéril y se dejó secar. La dilución que se utilizó era la que mostraba una señal similar a la penúltima gota de la línea control.

3. Procesamiento de las muestras

Como material de partida se utilizaron flores en estadios tempranos de desarrollo; previo a la antesis, estas se fijaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado de procesamiento de material vegetal para microscopía. La inclusión en parafina se realizó en el procesador de tejidos (Leica), el cual fue programado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4. Prehibridación e hibridación

Los cortes histológicos se deparafinaron con Histo-Clear, posteriormente mediante una serie decreciente de etanol (100%, 95%, 70%, 50%, 30% y agua), dos minutos en cada una, se hidrataron. Luego los cortes se hidrolizaron en HCl 0.2 M por 20 min, después se hicieron lavados de cinco minutos cada uno, uno con agua ultrapura, dos con SSC 2X (Stock 20X: 0.3 M Citrato de sodio, 3 M NaCl pH 7.0) y otro nuevamente con agua ultrapura. Posteriormente se agregó Proteinasa K (1 μ g/ml en tampón: Tris 100 mM y EDTA 50 mM pH8.0) y se incubó a 37 °C por 18 minutos. Tras la incubación los cortes se enjuagaron con PBS 1X (Stock 20X: 2,75 M NaCl, 50 mM KCl, 200mM Na₂HPO₄, 35 mM KH₂PO₄, pH 7.4) por 2 min, y para el bloqueo de la proteinasa K se utilizó glicina 0.2% (2 mg/ml de PBS) durante 2 minutos seguido de dos lavados con PBS 1X

por 2 minutos. Luego se procedió a refijar el tejido utilizando una solución de formaldehído 4% en PBS sumergiendo los portaobjetos por 10 minutos. Se lavaron nuevamente con PBS y por último el tejido se deshidrató en series crecientes de etanol de 2 minutos cada una (agua ultra pura, 30%, 50%, 70%, 95% y 100%) y se dejaron secar.

Para la hibridación, las sondas se diluyeron en tampón de hibridación, TH: 10X salts, formamida desionizada al 50%, tRNA de levadura 100 µg/mL, solución Denhardt's 50X y Dextran sulfato al 50%) a razón de 2 µl sonda/ 32 µl de TH. Luego se llevo a cabo la desnaturalización a 80°C durante 2 minutos. Luego se pusieron 50 µl de la solución de hibridación en cada portaobjeto y se colocó un cubreobjetos sobre cada uno para incubarlos durante una noche en cámara húmeda a 50 °C.

5. Lavados e inmunodetección colorimétrica

Se realizaron tres lavados en SSC 2X con 50% de formamida (v/v) a la temperatura de hibridación (50°C), un primer lavado de 30 min y otros dos de 1 h y 30 min cada uno. Tras los lavados los portaobjetos se incubaron en TBS 1X durante 5 minutos y posteriormente 1h en Blocking Reagent 0.5% en TBS 1X (Roche). Luego los portaobjetos se lavaron en BSA 1% y tritón X-100 0.3% en TBS 1X durante 30 minutos y después se incubaron con el anticuerpo anti-Dioxigenin-AP, Fab fragments de Roche, diluido en la misma solución anterior (1:3000). Posteriormente se utilizó una solución BSA 1% y tritón X-100 0.3% en TBS 1X para realizar 3 lavados de 20 minutos cada uno. Tras los lavados los portaobjetos se sumergieron en el tampón de detección (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 M MgCl₂, pH 9.5) en el que se incubaron 5 minutos, esta solución se reemplazó por 50 ml del tampón de detección que contenía el sustrato (75 µL de NBT (100 mg/ml) y 75 µL de BCIP (50 mg/ml) de Roche®) para proceder con la incubación en oscuridad durante un tiempo superior a 48 horas hasta que se observó la señal. Finalmente la reacción se detuvo cambiando la solución de detección por agua. Las muestras se dejaron secar, se montaron con Merckglass (Merck) y se visualizaron bajo el microscopio óptico.

G. Transformación de plantas

Para identificar y caracterizar la expresión del gen *SIMYB* se transformaron plantas de tomate y de *Arabidopsis thaliana*. La construcción del promotor (2kb) del gen *SIMYB* fusionado al gen *uidA* fue previamente elaborada en el laboratorio (Figura 7).

1. Transformación de *Arabidopsis thaliana* y análisis de plantas transgénicas

Para la transformación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se ha utilizado la planta silvestre del ecotipo Columbia (Col). Para realizar la transformación aproximadamente unas 60 semillas de *Arabidopsis* se cultivaron en macetas de 12 cm de diámetro. Transcurridas unas dos semanas desde la siembra, se eliminaron algunas plantas con el fin de facilitar el crecimiento homogéneo y adecuado de la población. Una vez las plantas habían producido el tallo floral, cuando la última hoja se había separado unos 2-3 cm del ápice de la inflorescencia principal, este se decapitó para eliminar la dominancia apical e inducir así la proliferación de las inflorescencia laterales. Una vez decapitadas, las plantas se cultivaron unos 4 días más antes de la infiltración.

Tres días antes de la infiltración, se inoculó 10 ml de medio LB, el cual contenía 100 µg/ml de rifampicina y 50 µg/ml de kanamicina, con un glicerinado de la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* portadora de las construcciones de interés. El cultivo se incubó durante toda la noche en

oscuridad a 28°C con agitación a 200 rpm. Al cabo de ese tiempo, se inoculó un matraz con 600 ml de medio LB con kanamicina (50 µg/ml) con los 10 ml del precultivo anterior y se incubó en las mismas condiciones durante 48 h. El día de la infiltración, el cultivo se recogió por centrifugado y el sedimento con las bacterias se resuspendió en 200 ml de medio de infiltración (2.2 g/l sales MS (Duchefa), 5% sacarosa, 1mg/l 6-BAP, 100 mg/l MES, pH5.9) Antes de la infiltración se le quitaron a las plantas todas las silicuas fertilizadas así como las flores abiertas. Para la infiltración, las macetas se invertían y se introducían en una fiambra que contenía los 200 ml de la suspensión de *Agrobacterium* en medio de infiltración, de manera que no sólo los ápices florales sino también las hojas de roseta quedaban sumergidos en el líquido por 2 minutos. Pasado este tiempo las plantas se sacaban de la fiambra y se secaban ligeramente, escurriéndolas sobre un trozo de papel absorbente. Las plantas así tratadas se cubrían con bolsas de plástico y se devolvían a las cabinas de cultivo donde se les permitía que siguieran creciendo. Durante los 2-3 días siguientes a la infiltración se iban haciendo agujeros en las bolsas, con el fin de aclimatar las plantas a las condiciones habituales, hasta que se eliminaban definitivamente. Las plantas se cultivaron hasta obtener silicuas maduras.

Cuando las silicuas de las plantas transformadas estuvieron maduras se recogieron las semillas, se guardaron en bolsas de celofán y se incubaron en una estufa a 37 °C durante al menos una semana. Para la selección de los transformantes primarios (T1), las semillas procedentes de plantas individuales T₀ se esterilizaron, se sembraron en cajas Petri de 15 cm de diámetro con medio de selección de kanamicina y se cultivaron en cabinas de cultivo *in vitro*. Después de 7 a 10 días desde la siembra, los transformantes eran claramente identificables por su color verde y sus raíces desarrolladas. Estas plantas se transplantaron a alvéolos (6.5 x 6.5 x 5 cm) con una mezcla de turba: vermiculita: perlita (1:1:1) y se trasladaron al invernadero para su cultivo hasta la obtención de semillas.

2. Transformación de *Solanum lycopersicum* (cv. Moneymaker)

Para la obtención de plantas transgénicas se procedió de acuerdo al protocolo de transformación genética de cotiledones descrito por (Ellul *et al.*, 2003) con algunas modificaciones.

2.1 Esterilización y germinación de semillas

Al menos 150 semillas fueron sumergidas durante 30 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 2% con dos gotas de 7X Tween-20, al cabo de ese tiempo se realizaron tres lavados seriados con agua destilada estéril durante 5, 10 y 15 minutos respectivamente. Las semillas se colocaron en placas Petri que contenía papel de filtro húmedo (3 ml de agua estéril), luego se cerraron las placas con parafilm y se guardaron en oscuridad a 24 ± 2 °C durante 48 horas. Transcurrido el tiempo las semillas germinadas se pasaron a medio de germinación (MG) y se incubaron durante 10 días en condiciones de fotoperíodo estándar, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

2.2 Cultivo de explantes primarios

Como explante primario se tomaron cotiledones de plántulas con 12 días de edad. A cada cotiledón se le hicieron cortes en sus extremos para facilitar el sitio de entrada de *Agrobacterium tumefaciens*. Los explantes se colocaron con el envés en contacto con el medio de inducción de organogénesis IK 4.0/4.0 dispuesto en placas Petri suplementado con 200 µM de acetosiringona,

este compuesto fenólico favorece la infección del tejido vegetal. La incubación se realizó en oscuridad a 26 ± 2 °C durante 24 horas.

2.3 Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación

Se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404, la cual contenía la construcción de interés. El cultivo bacteriano se incubó a 28°C en oscuridad y agitación constante, en medio LB suplementado con espectinomina (100µg/µl) como presión selectiva y se hicieron subcultivos cada 48 horas durante 8 días. Al octavo día se transfirieron 200 µl de cultivo bacteriano a 200 ml de LB suplementado con acetosiringona a una concentración de 200µM, manteniendo las mismas condiciones de incubación, hasta que alcanzará una densidad óptica de 0,6 a 0,8 (medida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm).

2.4 Cocultivo y lavado de explantes

Trascurridas 24 horas del cultivo de los explantes, estos fueron sumergidos en 150 ml de cultivo de *A. tumefaciens* durante 5 minutos. Tras la inoculación, se escurrieron en un bote con malla, en el cual se quedaron retenidos los explantes, se colocaron luego sobre papel filtro para secar el exceso de medio de cultivo e inmediatamente se colocaron con el envés en contacto con el medio de organogénesis IK 4.0/4.0 suplementado con 200 µM de acetosiringona. Se incubaron durante 48 horas con las mismas condiciones descritas para el cultivo de explantes primarios. Pasado el tiempo de incubación los explantes se lavaron en medio de lavado (ML) suplementado con cefotaxima a fin de detener el crecimiento bacteriano.

2.5 Inducción de organogénesis

Luego del lavado, los explantes se secaron en papel de filtro estéril para incubarlos posteriormente en medio organogénico IK 4.0/4.0 suplementado con cefotaxima, sin presión selectiva durante 48 horas en condiciones estándar. Trascurrido ese tiempo, se pasaron a medio organogénico IKZ 4.0/4.0/1.0 con presión selectiva (kanamicina 100 µg/ml), este medio permitió la formación de callos organogénicos. Cada dos semanas se realizó el subcultivo, alternando el antibiótico que detiene el crecimiento de la bacteria (cefotaxima y timentina). Cuando se observó que iban a pareciendo los brotes individuales, estos se separan del callo organogénico y se subcultivaban en medio de elongación (MEL), hasta que alcanzaron un tamaño mayor o igual a 1cm, posteriormente se transfirieron a medio de enraizamiento (ME).

2.6 Aclimatación de plantas en invernadero.

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

2.7 Soluciones y medio de cultivo utilizados

Solución mineral MS de Murashige y Skoog (1962)

MS	(mg/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1.650
KNO ₃	1.900

CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	(mg/L)
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeNa.EDTA	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3

Solución vitamínica

Vitaminas	(mg/l)
Riboflavina	0.25
Ácido Nicotínico	2.5
Tiamina-HCl	10
Piridoxina-HCl	1
Ácido fólico	0.5
Biotina	0.05
Pantotenato de Calcio	0.5
Clh Colina	0.1
Glicina	0.5
L-cisteína	1
Ácido málico	10
Ácido ascórbico	0.5

Nota: las vitaminas deben disolverse en agua, se preparan soluciones stock concentradas 100X de las mismas, y se almacenaron a -20 °C; se agregan al medio antes de ajustar el pH.

Medios de cultivo

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

		Medio de lavado	Medio de inducción de organogénesis	
	(g/L)	(ML)	IK 4.0/4.0	IKZ 4.0/4.0/1.0
Solución Mineral	MS	X	X	X
Sucrosa	30	X	X	X
Myo-inositol	0.1	X	X	X

Tiamina-HCl	0.001	X	X	X
Vitamina SH	SH	X	X	X
IAA	0.004	X	X	X
Kinetina (K)	0.004	X	X	X
Zeatina (Z)	0.001			X
Agar (g)	8		X	X

Medio de enraizamiento	(g/L)
Solución mineral	MS
Sucrosa	20
Myo-inositol	0.1
Tiamina-HCl	0.001
IAA	0.0001
Agar	8

Notas

El pH del medio fue ajustado a 5.7 con KOH antes de añadir el agar.

La esterilización se llevó a cabo por calor húmedo en autoclave, a 15 libras de presión a 120 °C durante 20 minutos.

La zeatina se esterilizó por microfiltración y se agregó al medio inmediatamente antes de servir las placas.

Medio LB (Luria-Bertani)	(g/L)
bactotriptona	10
Extracto de levadura bacto	5
NaCl	10

Medios de cultivo estándar

Etapa del proceso	Medio de cultivo	Antibióticos (mg/L)		
		Kanamicina	Timentina	Cefotaxima
Precultivo	IK (4.0/4.0)	-	-	-
Cocultivo	IK(4.0/4.0) +acetosiringona (200 µM)	-	-	-
Lavado	IK (4.0/4.0) líquido			300
Cultivo sin presión de selección	IK (4.0/4.0)	-	-	300
Cultivo con presión de selección	IKZ (4.0/4.0/1.0)	100	300*	300*
Enraizamiento	RM	100	300*	300*

(*)Para evitar que la bacteria creara resistencia al antibiótico la timentina y la cefotaxima se iban alternando

H. Protocolo de tinción GUS.

Se analizó el fenotipo de la población correspondiente a la primera generación (T₁) de plantas transformadas con la construcción *pSIMYB::GUS*, para lo cual se cortó ápices florales de 20

plantas de *Arabidopsis* y se introdujeron en un eppendorf con acetona al 90%, manteniendo el material en hielo hasta su procesamiento. Luego se fijaron en acetona al 90% durante 20 min a temperatura ambiente, después se procedió a realizar lavados con la solución de tinción (buffer Fosfato 100mM, EDTA 10m M, Triton X-100 a 0.1%, 0.5mM $K_3Fe(CN)_6$, 0.5 mM $K_4Fe(CN)_6$) sin X-Gluc hasta 2 veces. Tras el lavado de los ápices se agregó 1 ml de la solución de tinción a la que se añadió 50 μ l de X-Gluc 20mM. Se procedió a infiltrar en bomba de vacío por 5 min hasta 3 veces y se dejó a 37 °C durante toda una noche. Pasado ese tiempo se eliminó el sustrato y se procedió a deshidratar el material en una serie de alcoholes (30, 50 , 70) por 30 segundos en cada uno para luego fijarlas en FAA (5% Formamida, 50% Etanol y 50% Ácido acético) por 3 horas a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se colocaron en alcohol de 70% y se guardaron hasta su observación al microscopio de luz y fotografiado. El mismo protocolo se utilizó para tomate.

IV. RESULTADOS

A. Análisis del patrón de expresión espacio temporal del gen *SIMYB* en *Solanum lycopersicum*

Para analizar el patrón espacio temporal de *SIMYB* se generaron plantas transgénicas de tomate en las que el promotor del gen *SIMYB* se encontraba fusionado a un gen reportero (*uidA*). En concreto se pretendía estudiar el patrón espacio temporal de dicho gen en estas líneas reporteras obtenidas por transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

Para ello, la construcción pMYB::GUS (Figura 7), disponible en el laboratorio, se introdujo en la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 por ser la más adecuada para experimentos de transformación en tomate.



Figura 7: Construcción utilizada para transformar tomate y Arabidopsis. Esta construcción contiene el gen *nptII* el cual confiere resistencia a kanamicina en las plantas y 2 Kb de la secuencia promotora del gen *SIMYB*, responsable de dirigir la expresión del gen *uidA*.

Para comprobar que las construcciones en *Agrobacterium* eran adecuadas, se picaron 4 colonias y se pasaron a cultivo líquido en tubos para obtener minipreps de la cepa LBA4404 transformada. Luego de cuantificar en Nadrodop la cantidad de DNA, se procedió a retrotransformar en *E. coli* cepa DH10B. Al cabo de 1 hora de cultivo en agitación a 37°C se procedió a plaquear en medio LB suplementado con espectinomicina 100mg/ml. Se obtuvieron las minipreps a partir de *E. coli* para comprobar la presencia de la inserción mediante una digestión enzimática con *Eco* RI y observación en un gel de agarosa al 1% (Figura 8).

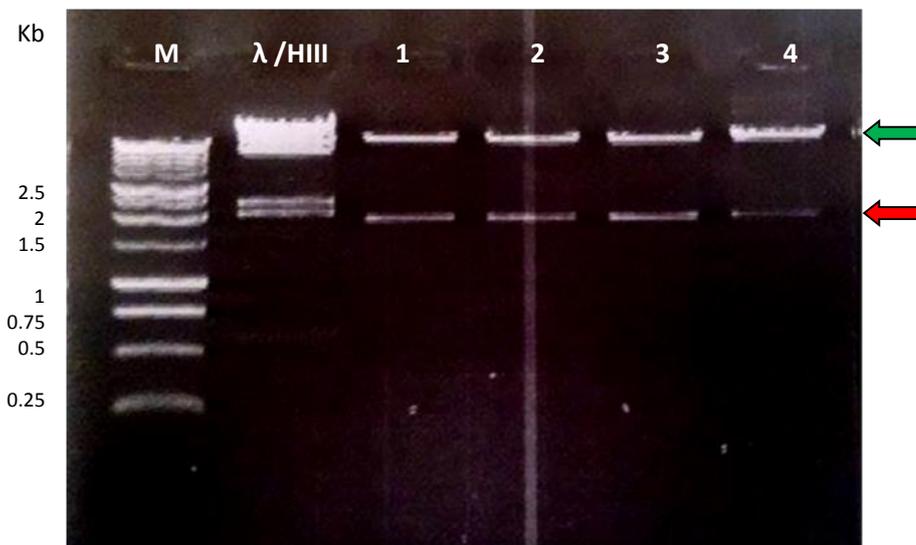


Figura 8: Gel de agarosa al 1% para comprobar la inserción de la construcción pSIMYB::GUS.

Digestión con *Eco* RI de los plásmidos purificados. La flecha roja señala la banda que corresponde a la inserción (2Kb) y, la flecha verde señala el plásmido (12,7 Kb).Kb: Kilobases ; M: Marcador 1kb Ladder Plus Invitrogen; λ/HIII: DNA genómico del fago lambda digerido con Hind III; 1-4: Muestras de minipreps.

La construcción *pSIMYB::GUS* se utilizó para transformar genéticamente plantas de tomate del cultivar Moneymaker. Se utilizó la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* y como material vegetal explantes de cotiledones. La metodología utilizada fue la descrita por Ellul *et. al* (2003) con algunas modificaciones (ver Materiales y Métodos). Durante el proceso de transformación se obtuvieron también explantes sin inocular con *A. tumefaciens*, los cuales se regeneraron por cultivo *in vitro*. Estas plantas, no transgénicas, son los testigos externos (TE) de la transformación y se utilizan como control en posteriores análisis.

Después de tres semanas los explantes inoculados con *A. tumefaciens* que llevaban la construcción de interés comenzaron a formar callos resistentes a kanamicina, en donde se podían apreciar algunas zonas verdes compactas correspondiente a las yemas (Figura 7 A y B).

Al cabo de seis semanas de cultivo en medio de inducción organogénica, la mayoría de los callos mostraban yemas-ápice y comenzaron a aparecer los primeros brotes adventicios. A partir de esta etapa se iban descartando las áreas necrosadas e individualizando los brotes elongados en cada subcultivo, los cuales fueron transferidos a un medio organogénico sin presión de selección para favorecer el desarrollo y elongación de órganos (Figura 9 C y D). A medida que iban creciendo los brotes individuales con un tamaño mayor de 1cm se transferían a un medio de enraizamiento suplementado con kanamicina, donde permanecieron hasta que las primeras raíces elongaron lo suficiente para ser transferidas a macetas, a partir de esta etapa las plantas se aclimataron en invernadero (ver materiales y métodos). El experimento permitió obtener 3 brotes enraizados para la construcción *pSIMYB::GUS*.

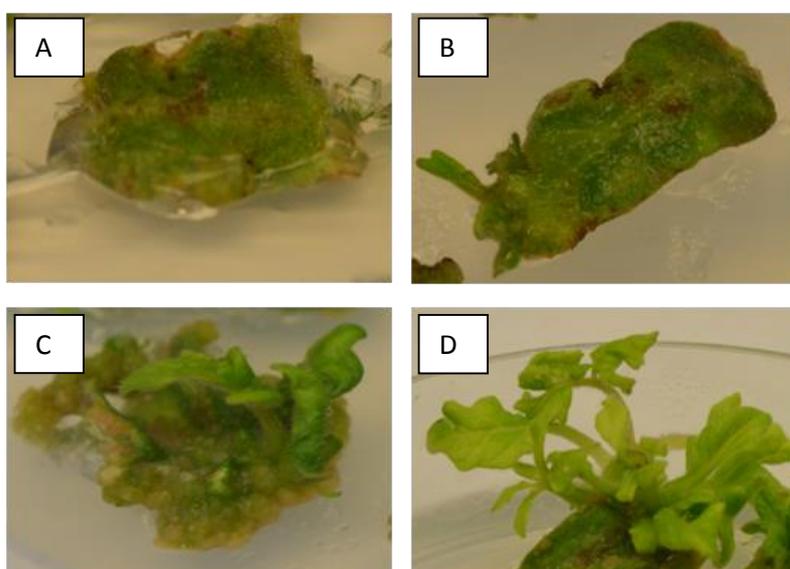


Figura 9: Respuesta organogénica de explantes de cotiledón inoculados con *Agrobacterium tumefaciens*. A: Callo organogénico. B: Callo organogénico con presencia de yemas-ápices. C: Brote adventicio con 6 semanas de cultivo. D: Brote elongado para individualizar.

1. Caracterización de las plantas transgénicas

De los 3 brotes enraizados solamente se obtuvieron 2 plantas que se aclimataron a las condiciones de invernadero. Así para comprobar la presencia del T-DNA, se evaluó la presencia del gen *ntplI*, que confiere resistencia a kanamicina. Para ello se realizó una PCR a partir del DNA genómico aislado de hojas jóvenes de plantas transgénicas con oligonucleótidos específicos. Solamente en una de las líneas se detectó la presencia de un fragmento de 583pb correspondiente al gen de selección (Figura 10)

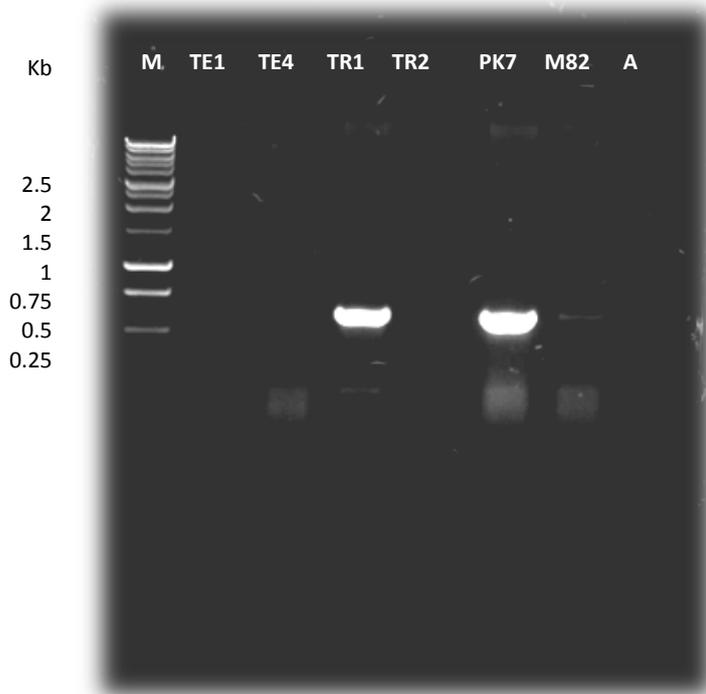


Figura 10: Genotipado de las plantas transgénicas de tomate. PCR de DNA genómico para detectar gen *ntpII* (583pb). Kb: Kilobases; M: Marcador de peso molecular Kb ladder, TE1: testigo 1, TE4: testigo 4, TR1: planta transgénica1 TR2: planta transgénica2, PK7: control positivo, M82: control negativo., A: agua. La planta TR1 es resistente a la kanamicina y además posee el gen *ntpII* por lo que sería una línea transgénica.

De acuerdo con los resultados anteriores se procedió a realizar la tinción GUS para esta planta transgénica, para lo cual se tomaron muestras de botones florales en estadios de preantesis y antesis. Se llevaron a cabo 3 ensayos con distintos tiempos de incubación con el sustrato (16h, 48h 35h), sin embargo no se observó coloración azul en ningún tejido floral y en ninguno de los ensayos. Por ello se procedió a realizar una PCR de DNA genómico para comprobar que esta planta había insertado adecuadamente el gen *uidA* (Figura 11). Se utilizaron dos oligos específicos que amplifican un fragmento de 894 pb del gen *uidA* (ver oligos en material y métodos). Para este ensayo se utilizó como control positivo DNA genómico de una planta transgénica de Arabidopsis positiva para el ensayo GUS. El resultado de este análisis evidenció que la planta de tomate TR1 positiva para la kanamicina, no presentaba la banda correspondiente a la presencia del gen delator *uidA* (GUS).

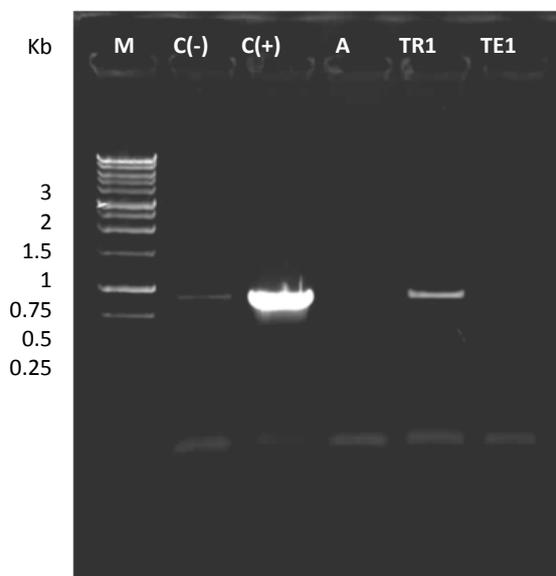


Figura 11: Genotipado de las plantas transgénicas de tomate. PCR de DNA genómico para detectar gen *uidA* (894pb). Kb: Kilobases; M: Marcador, C(-): control negativo, C(+): control positivo, A: Agua, TR1: planta, TE1: planta testigo 1. La banda tenue de TR1 es una amplificación inespecífica.

B. Localización del transcrito del gen *SIMYB* mediante hibridación *in situ*.

Para determinar la expresión del gen *SIMYB* en tejidos florales, se realizó un ensayo de hibridación *in situ* usando un RNA marcado con digoxigenina como sonda. Para la síntesis de la sonda se utilizó cDNA aislado de flores, mediante una reacción de PCR con los oligos adecuados (Ver tabla de oligonucleótidos utilizados) se amplificó el fragmento de 290 pb correspondiente a la región 3' del gen *SIMYB*. Una vez purificado este fragmento se procedió a clonar en pCR8 y para comprobar que se haya integrado al plásmido se evaluó el producto de la digestión enzimática con *EcoRI* en un gel de agarosa (Figura 12).



Figura 12: Producto de digestión de pCR8-(SIMYB) 290pb con enzima *EcoRI*: M: Marcador 1 kb ladder plus de invitrogen; 1-9: clones evaluados. La flecha roja señala en el carril 5-7 y 9 el fragmento de 290 pb correspondiente al inserto.

Una vez identificados los clones se mandaron a secuenciar para identificar si se han integrado en sentido o antisentido respecto al promotor T7. Luego se llevó a cabo la síntesis y marcaje de la sonda para realizar la hibridación de acuerdo al apartado de materiales y métodos.

La evaluación de la señal de hibridación se llevó a cabo en estadios de preantesis (3mm y 6 mm) y antesis en flores no polinizadas. La hibridación *in situ* mostró que en las flores de 3mm, la señal se encuentra localizada en estambres a nivel de las anteras, y en los carpelos a nivel de placenta y óvulos inmaduros (Figura 13 A-C). En las flores de 6mm de longitud la señal se localizó en anteras y óvulos siendo menos intensa que en las de 3mm (Figura 13 E).

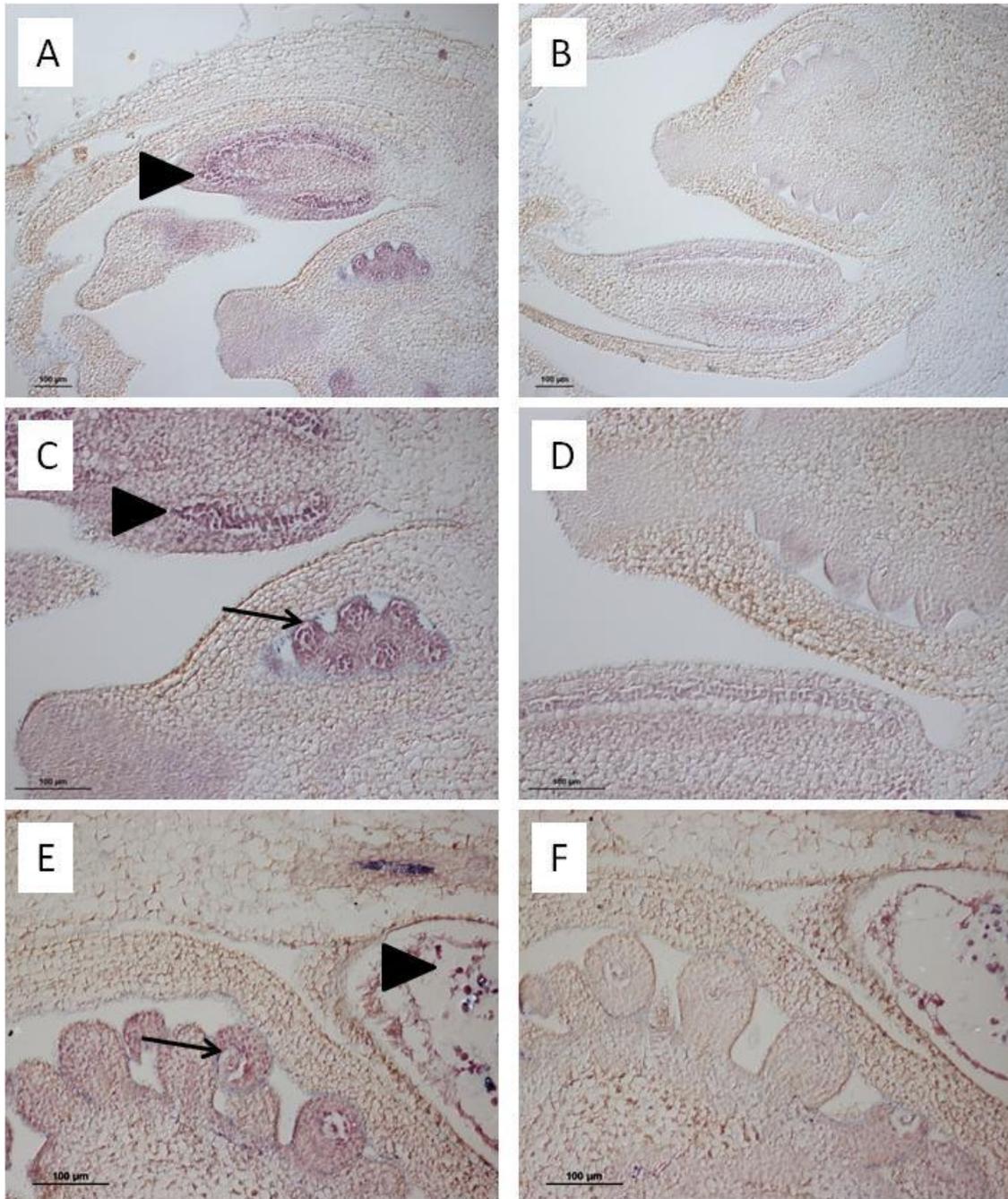


Figura 13: Localización del transcrito del gen *SIMYB* en flores de tomate cv. Moneymaker mediante hibridación *in situ*. A, C, E: Las flechas indican señales de hibridación en óvulos, las cabezas de flecha señalan de hibridación en anteras. A-D: flor de 3 mm, E-F: flor de 6 mm. B, D y F: controles negativos. Las barras representan 100 µm.

En las flores en estadio de antesis, la señal de hibridación se localizó en los la placenta y óvulos, asimismo, se observó señal en el tejido de transmisión del estilo. El polen también presenta señal (Figura 14).

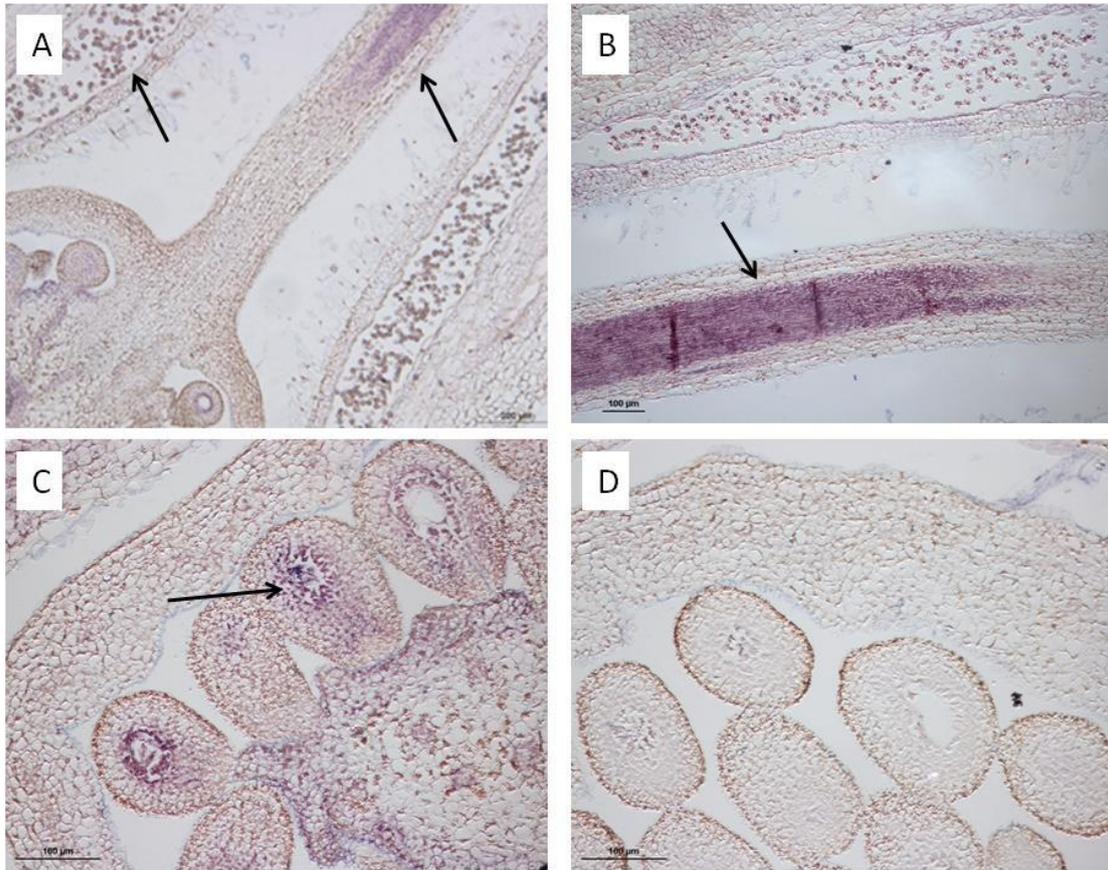


Figura 14: Localización del transcrito del gen *SIMYB* en flores en antesis de tomate cv. Moneymaker mediante hibridación *in situ*. A: Las flechas indican señales de hibridación en polen y en tejido de transmisión del estilo. B: señal en el tejido de transmisión del estilo señalado por una flecha. C: la flecha indica señal en óvulos. D: control negativo. Las barras en A, C y D representan 100μm y en B, 200μm.

C. Análisis del patrón espacio temporal del gen *SIMYB* en *A. thaliana*

De las 20 líneas evaluadas, 17 líneas mostraron un patrón idéntico de una coloración azul a nivel de las anteras y parte del gineceo. De las 17 líneas se llevó a cabo un análisis macroscópico de las flores el cual permitió evidenciar que la expresión del gen se dirige a los verticilos florales más internos (Figura 15 A), pues se tiñe de azul la porción distal del gineceo en la que se ubican dos señales puntuales diametralmente opuestas y las anteras (Figura 15 B)

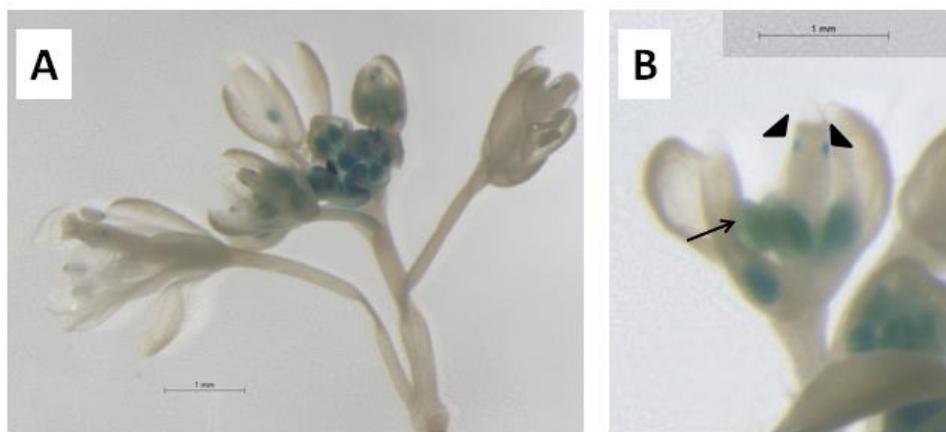


Figura 15: Patrón de expresión del gen *SIMYB* en flores de *Arabidopsis thaliana*. A: El color azul indica el lugar en donde se expresa el gen. B: Vista a mayor aumento de la inflorescencia en la que la flecha indica la expresión en anteras y las cabezas de flecha en estilo. Las barras en A y B representan 1mm.

Al estudiar en mayor detalle en que estructura del gineceo y del androceo se expresa el gen, se procedió a evaluar por microscopía cortes transversales y longitudinales de las flores y se observó que a nivel del gineceo la expresión se localizó en el estilo como dos señales diametralmente opuestas, no se evidencio expresión en óvulos maduros (Figura 16 A y B).

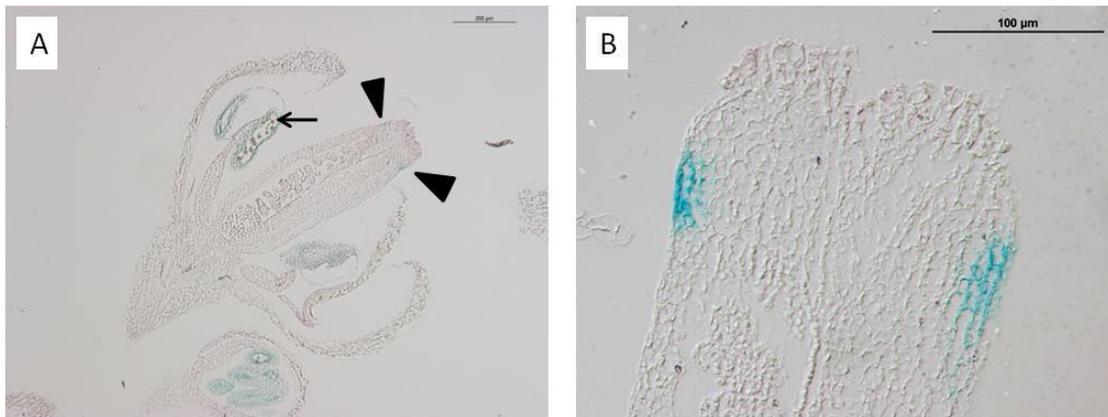


Figura 16: Expresión del gen reportero *uidA* dirigida por el promotor del gen *SIMYB*. Corte longitudinal de flor de *A. thaliana*. A: Flor en estadio 9, la flecha señala una antera teñida de azul; las cabezas de flechas indican dos zonas puntuales del estilo teñidas de azul. B: Vista a mayor aumento en que se ve claramente la señal en estilo. Las barra en A representa 200μm.

En el androceo, la expresión se localizó en las anteras, siendo más fuerte la señal en las células del tapetum y en el polen. (Figura 17 A y B).

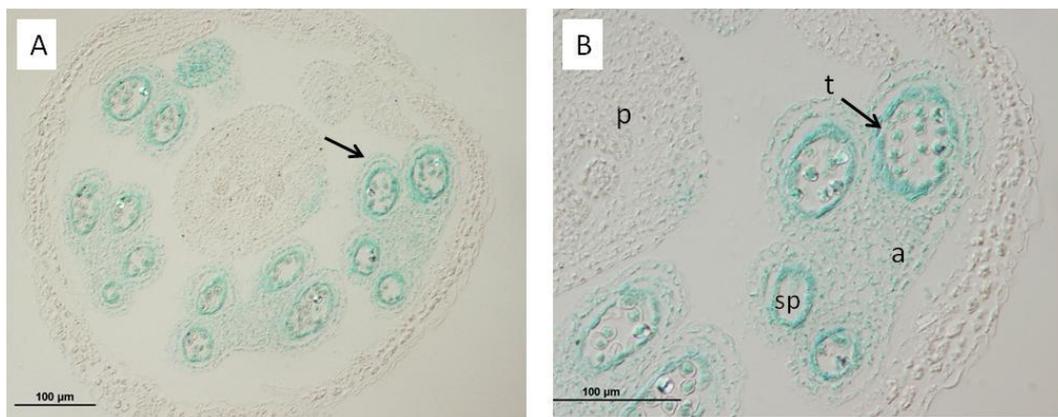


Figura 17: Expresión del gen reportero *uidA* dirigida por el promotor del gen *SIMYB*. Corte transversal de flor de *A. thaliana*. A: El color azul indica que la expresión se localizaría en todas las células que forman la antera, señalado por una flecha. B: Vista de la antera en mayor aumento. (a) antera, (t) tapetum, (sp) saco polínico, (p) pistilo. Las barras 100 μm respectivamente.

V. DISCUSIÓN

Con los avances en la investigación genómica de la década pasada la biología vegetal ha visto numerosos estudios que presentan análisis cuantitativos de expresión génica a gran escala. Los microarrays y la secuenciación de nueva generación son enfoques que se utilizan para investigar procesos de respuesta a estrés, fisiológicos y del desarrollo; diseccionar rutas epigenéticas y de pequeños RNAs y construir grandes redes génicas regulatorias (Rensink y Buell, 2005). Fue precisamente un estudio de microarray el que permitió identificar al gen *SIMYB* (Medina 2010, Tesis Doctoral). Para comprender plenamente el papel biológico de un gen, es esencial conocer su patrón de expresión espacio temporal a un nivel celular.

Varios métodos se utilizan para el análisis detallado de los patrones de expresión génica, uno de ellos es el análisis de líneas reporteras transgénicas. Tal análisis puede sin embargo consumir mucho tiempo si se analizan múltiples genes o se trabajan con plantas recalcitrantes a la transformación. Por otra parte, típicamente se requiere de una validación independiente para asegurar que los patrones de expresión del transgén imitan la expresión del gen endógeno. La hibridación *in situ* de mRNA representa una alternativa relativamente rápida para la visualización directa de la expresión del gen dentro de células y tejidos. Este método tiene la ventaja de que puede ser utilizado fácilmente en cualquier gen de interés. La hibridación *in situ* permite la detección de mRNA diana en las células por hibridación con un RNA-antisentido marcado obtenido por transcripción *in vitro* del gen de interés (Javelle, Marco y Timmermans, 2011). Al contrario de lo que ocurre en los análisis de expresión mediante métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), mediante la hibridación *in situ* es posible identificar la localización precisa de los transcritos en el tejido. Uno de los objetivos del presente trabajo es identificar el lugar en que se expresa el gen *SIMYB*; por lo que la técnica de hibridación *in situ* de mRNA es adecuada para cumplir con dicho objetivo. Los resultados se compararán con la localización del transcrito obtenida en plantas transgénicas reporteras *pSIMYB::GUS* de tomate y *Arabidopsis*.

1. El gen *SIMYB* se expresa en los tejidos reproductivos de la flor en tomate

En tomate el gen *SIMYB* codifica la proteína R2R3-MYB de 195 aminoácidos la cual se localiza en el citoplasma y en el núcleo, lo cual sugiere que esta proteína actuaría como un factor de transcripción. (Hassanien 2013, TFM). Los factores de transcripción R2R3-MYB comparten ciertas características en común, por ejemplo, mediante ensayos *Northern blot* para diferentes factores de transcripción en la especie modelo *A. thaliana* se determinó que cada gen R2R3-MYB, tienen un patrón único de expresión (Krantz *et al.*, 1998).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las señales de hibridación *in situ* se localizaron tanto en estructuras del androceo como del gineceo. En el androceo se observó señal a nivel de las anteras de los estambres y el polen; mientras que en el gineceo a nivel de placenta, óvulos y tejido de transmisión del estilo.

Los ensayos de hibridación *in situ* permitieron localizar la señal en las anteras, a nivel de las células del tapetum de flores de 3mm, de 6 mm y en antesis. La expresión de factores tipo MYB en anteras ha sido reportada anteriormente, en tabaco se identificaron dos cDNAs (*NtMYBAS1* y *NtMYBAS2*) que codifican para proteínas relacionadas a MYB (Yang *et al.*, 2001). Ensayos de *Northern blot* e hibridación *in situ* revelaron que estos transcritos se expresan específicamente en tejidos esporofíticos y gametofíticos de la antera incluyendo el tapetum, el estomio, tejido vascular y polen en desarrollo. Además se demostró que *NtMYBBAS1* es un factor de transcripción específico de antera el cual es probablemente regulador de la fenilalanina amonio liasa y de la síntesis de propanoides en tejidos esporofíticos pero no gametofíticos de la antera (Yang *et al.*, 2001).

Los ensayos de hibridación en las flores de tomate mostraron señal de hibridación del transcrito de *SIMYB* en placenta, los óvulos inmaduros y en el tejido de transmisión del estilo. La expresión de genes tipo MYB en el estilo ha sido reportado en un estudio llevado a cabo con *Antirrhinum majus* (Jackson *et al.*, 1991). Se estudiaron los patrones de expresión de seis genes tipo MYB. Uno de estos genes se expresaba principalmente en el nectario y en el tracto de transmisión del estilo, dos tejidos con mayor actividad secretoria en la flor, sugiriendo además que la función de este gen estaría relacionada con la secreción de carbohidratos (Jackson *et al.*, 1991). Por otro lado, ensayos de hibridación *in situ* en plantas de *A. majus* se muestran que la distribución del mRNA de *MYB-305* se correlaciona bien con la distribución de la proteína MYB-305 detectada por inmunolocalización con el anticuerpo anti-Myb305 (V. Hoher y C. Martin, resultados no publicados). Dentro de la pared placentaria, óvulos, tejidos de transmisión del estilo y nectarios, los patrones de expresión de MYB-305 y MYB-340 fueron similares (Moyano *et al.*, 1996).

MdMYB3 es un factor de transcripción tipo R2R3-MYB, el cual regularía la acumulación de antocianina en la cáscara del fruto de *Malus domestica*, también estaría implicado en la regulación del desarrollo floral, particularmente en el desarrollo del pistilo. Al estudiar líneas transgénicas de tabaco que expresan *MdMYB3* de manzano se vio que éstas desarrollaban flores con pedúnculos y estilos más largos que las flores de plantas silvestres. De particular interés son estos estilos elongados y como resultan en estigmas que están posicionados por encima de la antera de la flor (Vimolmangkang *et al.*, 2013). Estos estudios previos y nuestros resultados apoyan la idea que *SIMYB* regularía el desarrollo del pistilo.

Si bien en nuestros ensayos no se ha visto expresión del gen *SIMYB* en pétalos, algunos factores de transcripción del tipo MYB regulan aspectos de la forma celular en la corola; así se ha reportado que *AmMYBL2* codifica un factor de transcripción MYB tipo R2R3 que esta cercanamente relacionado a MIXTA y que se expresa en flores de *A. majus*; MIXTA es un gen de *A. majus* que se ha visto es responsable de la forma cónica de las células epidermales de los pétalos (Noda, 1994).

2. Un fragmento de 2Kb del promotor del gen *SIMYB* dirige la expresión del gen delator *uidA* a anteras y estilo en *Arabidopsis*.

Las regiones genómicas adyacentes a los genes contienen secuencias reguladoras que actúan sobre el promotor del gen y determinan su patrón de expresión (Alberts et al, 2013). Así, para identificar estas regiones es importante el estudio de las regiones promotoras de los genes. El hecho de utilizar un promotor de un gen para dirigir la expresión a un órgano específico de la planta podría funcionar como herramienta biotecnológica; por ejemplo, se ha logrado desarrollar plantas androestériles en diferentes especies utilizando el promotor específico de anteras del gen *PsEND1* para dirigir la expresión del gen citotóxico barnasa a estos órganos (Roque et al., 2007; Medina et al., 2013).

En este estudio analizamos una región de 2kb de la región promotora del gene *SIMYB* y mediante fusiones con el gen delator *uidA* (GUS) determinar si ésta región es suficiente para reproducir el patrón de expresión nativo del gen, previamente determinado mediante hibridación *in situ*.

Los ensayos de transformación estable en tomate no han sido exitosos y no se ha podido obtener ninguna línea transgénica pSIMYB::GUS. La única línea obtenida contiene el gen de *nptII* que confiere resistencia a kanamicina, pero no el gen *uidA* completo. Durante el proceso de integración del T-DNA se pueden producir inserciones, deleciones o duplicaciones de este (Binns 1988; Zambryski 1988). Se han realizado estudios de correlación entre pérdida del transgén tras la inserción del T-DNA y la especie (Kim, 1998). La integración del T-DNA en el genoma huésped depende totalmente del sistema de recombinación/ mecanismo de reparación endógena de las plantas (Mayerhofer et al., 1991). Por otro lado, los análisis de las secuencias de inserción del T-DNA y de sus respectivos sitios de pre-inserción en el genoma de la planta han revelado que el borde izquierdo está menos conservado que el borde derecho. Se han realizado estudios donde se muestra que frecuentemente se producen inserciones aberrantes del TDNA que en la gran mayoría de los casos se truncan desde el borde izquierdo (Mayerhofer et al., 1991). Estos estudios anteriores podrían explicar nuestros resultados fallidos en la obtención de la línea transgénica estable.

Sin embargo la misma construcción se introdujo en plantas de Arabidopsis (transformación por agroinfiltración) y se obtuvieron 20 líneas transgénicas todas ellas kanamicina positivas y que muestran el gen reportero GUS dirigido por la secuencia promotora utilizada del gen *SIMYB*. De las líneas reporteras en Arabidopsis se observó que el promotor del gen *SIMYB* (factor de transcripción MYB tipo R2R3) dirige la expresión del gen *uidA* a órganos florales principalmente a las anteras (a nivel de las células del tapetum), polen y a dos zonas puntuales de la superficie del estilo que se coloreaban de azul y que eran diametralmente opuestas. Por otro lado, no se observó señal en óvulos, ni en ninguna estructura del ovario. El patrón de expresión es equivalente al patrón endógeno del gen *SIMYB* en tomate descrito por Hassanien (2013) en estudios de expresión mediante qRT-PCR donde se vio que los niveles más altos de expresión se daban en pistilos y estambres de flores de tomate en antesis.

En los ensayos de hibridación *in situ* para tomate se ha observado señal de hibridaciones en el polen, de la misma manera en los ensayos GUS el polen inmaduro de *A. thaliana* mostró coloración azul. Se ha reportado que cambios en los niveles de expresión de AtMYB32 y AtMYB4 puede influenciar en el desarrollo del polen mediante cambios en el flujo de la ruta de fenilpropanoides e influir en la composición de la pared del polen (Preston et al., 2004). Por otro lado, también se ha descrito que tres factores de transcripción tipo MYB en Arabidopsis, MYB97,

MYB101 y MYB120; controlan la diferenciación del tubo polínico requerido para la liberación de las células espermáticas (Leydon *et al.*, 2013).

Los estudios de expresión mediante qRT-PCR (Hassanien, TFM 2013) junto con nuestros resultados sugerirían que el factor de transcripción *S/MYB* podría estar implicado en el desarrollo de la antera y del tejido gametofítico (placenta, óvulos) inclusive podría estar implicado en la regulación de las interacciones del tejido estilar con el polen para el crecimiento del tubo polínico.

VI. CONCLUSIONES

- 1) El gen *SIMYB* se expresa en tejidos reproductivos de la flor de tomate lo que sugiere que podría estar implicado en el desarrollo de la flor y el cuajado del fruto.
- 2) El gen *SIMYB* se expresa en polen y en tejido de transmisión del estilo por lo que podría estar implicado en la regulación de las interacciones del tejido estilar con el polen.
- 3) Se ha identificado un fragmento de 2kb del promotor del gen *SIMYB* capaz de dirigir la expresión de genes a los tejidos de la antera y al pistilo en *Arabidopsis thaliana*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. D. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** (2013) Essential Cell Biology. 4th Edition, ISBN: 9780815344544.
- Aoki, K., Ogata, Y., Igarashi, K., Yano, K., Nagasaki, H., Kaminuma, E., et al.** (2013). Functional genomics of tomato in a post-genome-sequencing phase. *Breeding Science*. 63, 14–20.
- Arratia, J. y Aguirre, J.** (2013). Los Factores de transcripción tipo MYB, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16 (2): 98-108.
- Bai, Y., and Lindhout, P.** (2007). Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, 100(5), 1085–1094.
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., and Schmulling, T.** (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *PlantCell* 23, 69–80.
- Bauchet, G., and Causse, M.** (2012). Genetic Diversity in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and Its Wild Relatives, *Genetic Diversity in Plants*, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0185-7, InTech.
- Bergervoet, J., Verhoeven, H., Glilissen, L., and Bino, R.** (1996). High amounts of nuclear DNA in tomato. *Plant Science* 116, 141–145.
- Binns, A. N. T., M. F.** (1988) Cell Biology of Agrobacterium Infection and Transformation of Plants. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 42: 576-606.
- Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Pereira, L. E., Atares, A. and García-Martínez J. L.** (2012) Characterization of the *procera* Tomato Mutant Shows Novel Functions of the SIDELLA Protein in the Control of Flower Morphology, Cell Division and Expansion, and the Auxin-Signaling Pathway during Fruit-Set and Development. *Plant Physiology* 160, 1581-1596.
- Chamarro, J.** (2001). Plant Anatomy and physiology. In cultivation of tomato MUNDIPRENSA, ed Madrid, Barcelona, México.
- Cong, B., Barrero, L. S., Tanksley, S. D.** (2008). Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature Genetics* 40, 800–804.
- Cutler, D. F., Botha, T., Botha, C. E. J., and Stevenson, D. W.** (2008). *Plant Anatomy: An Applied Approach*. Wiley-Blackwell Press, Malden, MA, USA.
- Czerednik, A., Busscher, M., Bielen, B. A. M., Wolters-Arts, M., DeMaagd, R. A., and Angenent, G. C.** (2012). Regulation of tomato fruit pericarp development by an interplay between CDKB and CDKA1 cell cycle genes. *Journal of Experimental Botany* 63, 2605–2617.
- D. Jagatheeswari.** (2014) Morfological studies on flowering plants (Solanaceae). *International Letters of Natural Sciences* 15, 36-43.

- Devoghalaere, F., Doucen, T., Guitton, B., Keeling, J., Payne, W., Ling, T. J., et al.** (2012). A genomics approach to understanding the role of auxin in apple (*Malus domestica*) fruit size control. *BMC Plant Biology*. 12:7.
- de Jong, M., Wolters-Arts, M., Feron, R., Mariani, C., and Vriezen, W. H.** (2009). The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (*SIARF7*) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *Plant Journal* 57, 100-170.
- de Jong, M., Wolters-Arts, M., García-Martínez, J. L., Mariani, C., Vriezen, W. H.** (2011). The *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (*SIARF7*) mediates cross-talk between auxin and gibberellins signalling during tomato fruit set and development. *Journal Experimental of Botany* 2: pp.617–626.
- Ellul, P. E., Garcia-Sogo, B. G. –S., Pineda, B. P., Ríos, G. R., Roig, L. R., and Moreno, V. M.** (2003). The ploidy level of transgenic plants Agrobacterium-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum*. L Mill.) is genotype and produce dependent. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 106, 231-238.
- Favaro, R., Pinyopich, A., Battaglia, R., Kooiker, M., Borghi, L., Ditta, G., Yanofsky, M. F., Kater, M. M., Colombo, L.** (2003). MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in Arabidopsis. *The Plant Cell* 15, 2603–2611.
- Foolad, M. R.** (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics*, pp. 1–52.
- Fos, M. Nuez, F., and García-Martínez, J. L.** (2000). The Gene *pat-2*, Which Induce Natural Parthenocarpic, Alters the Gibberelin Content in Unpollinated Tomato Ovaries. *Plant Physiology* 122, 471-480.
- Fos, M., Proaño, K., Nuez, F., and García-Martínez, J. L.** (2001) Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by genetic system *pat-3/pat4* in tomato. *Physiologia Plantarum* 111, 545-550.
- Fu, F. Q., Mao, W. H., Shi, K., Zhou, Y. H., Asami, T., Yu, J. Q.** (2009) A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber. *Journal of Experimental Botany* 9: 2299–2308
- Génard, M., Bertin, N., Borel, C., Bussieres, P., Gautier, H., Habib, R., Lechaudel, M., Lecomte, A., Lescourret, F., and Lobit, P.** (2007). Towards a virtual fruit focusing on quality: Modelling features and potential uses. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, pp. 917-928.
- Gillaspy, G., Ben-David, H., and Grisse, W.** (1993). Fruits: A Developmental Perspective. *Plant Cell*, Vol. 5, pp. 1439-1451.
- Giménez, E., Pineda, B., Capel, J., Antón, M. T., Atarés, A., Pérez-Martín, F., et al.** (2010). Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the *Arlequin/TAGL1* gene during reproductive development of tomato. *PLoS ONE* 5:e14427. doi:10.1371/journal.pone.0014427.

- Hassanien, Abdalla.** (2013) Characterization of a MYB gene from tomato (*Solanum lycopersicum*) involved in fruit development. In Departamento de Biotecnología (Valencia: Universidad Politécnica de Valencia).
- Huang, Z., Van Houten, J., Gonzalez, G., Xiao, H., van der Knaap, E.** (2013). Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of SUN, OFP and YABBY gene family in tomato. *Molecular Genetics and Genomics* 288, 111–129.
- Hewitt, E. J.** (1966). Sand and Water Culture Method used in the Study of Plant Nutrition. Technical Communication N° 22. Commonwealth Bureau. London.
- Ho, L. C., and Hewitt, J. D.** (1986). Fruit development in The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement, eds J. G. Atherton and J. Rudich (New York: Chapman and Hall), 201–239.
- Itkin, M., Seybold, H., Breitel, D., Rogachev, I., Meir, S., and Aharoni, A.** (2009). TOMATO AGAMOUS-LIKE1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *Plant Journal* 60, 1081–1095.
- Jackson, D., Culianez-Macia, F., Prescott, A. G., Roberts, K., and Martin, K.** (1991) Expression Patterns of MYB genes from *Antirrhinum* flowers. *The Plant Cell* 3, 115-125.
- Javelle, M., Marco, C. F., Timmermans, M.** (2011) In Situ Hybridization for the Precise Localization of Transcripts in Plants. *Journal of Visualized Experiments.* (57), e3328, doi:10.3791/3328.
- Jia, H. F., Chai, Y. M., Li, C. L., Lu, D., Luo, J. J., Qin, L., et al.** (2011). Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology.* 157, 188–199.
- Karlova, R., Chapman, N., David, K., Angenent, G. C., Seymour, G. B., and de Maagd, R. A.** (2014). Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 65, N° 16: 4527-4541
- Karlova, R., Rosin, F. M., Busscher-Lange, J., Parapunova, V., Do, P. T., Fernie, A. R., Fraser, P. D., Baxter, C., Angenent, G. C., de Maagd, R. A.** 2011. Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *Plant Cell* 23, 923–941.
- Kobayashi, M., Nagasaki, H., Carcia, V., Just, D., Bres, C., Mauxion, J-P., Le Paslier M-C., et al.** (2013) Genome-Wide Analysis of Intraspecific DNA Polymorphism in ‘Micro-Tom’, a Model Cultivar of Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Physiology* 0(0): 1–10.
- Kranz, H. D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R. C., et al. (1998).** Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(2), 263–276.
- Larry, R., Joanne, L.** (2007). Genetic resources of tomato. In: Razdan MK, Mattoo AK, eds. Genetic improvement of solanaceous crops. Vol. 2. Tomato. Enfield, NH: Science Publishers.
- Leydon, A. R., Beale, K. M., Woroniecka, K., Castner, E., Chen, J., Horgan, C., et al.** (2013). Three MYB Transcription Factors Control Pollen Tube Differentiation Required for Sperm Release. *Current Biology* 23, 1209-1214

- Li, Z., Yang, H, Li, P., Liu, Y., Wang Y and Xu, F.** (2013) Fruit biomechanics based on anatomy: a review. *International Agrophysics*. Vol. 27 pp 97-106.
- Lippman, Z. and Tanksley, S. D.** (2001). Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. *Genetics* 158, 413–422.
- Lozano, R., Gimenez, E., Cara, B., Capel, J., Angosto, T.** (2009). Genetic analysis of reproductive development in tomato. *International Journal of Developmental Biology* 53:1635–1648.
- Mao, L., Begum, D., Chuang, H., Budiman, M., Szymkowiak, E., Irish, E., et al.** (2000). JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* 406, 910–913.
- Mapelli, S., Frova, C., Tori, G., and Soressi, G. P.** (1978). Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant and Cell Physiology* 19, 1281-1288.
- Mariotti, L., Picciarelli, P., Lombardi, L., and Ceccarelli, N.** (2011). Fruit-set and early fruit growth in tomato are associated with increases in indole acetic acid, cytokinin, and bioactive gibberellins contents. *Journal Plant Growth Regulation*. 30, 405–415.
- Marsch-Martinez, N., Ramos-Cruz, D., Irepan Reyes-Olalde, J., Lozano-Sotomayor, P., Zuniga-Mayo, V. M., and de Folter, S.** (2012). The role of cytokinin during Arabidopsis gynoecia and fruit morphogenesis and patterning. *Plant Journal*. 72, 222–234.
- Martí, C., Orzáez, D., Ellul, P., Moreno, V., Carbonell, J., Granell, A.** (2007) Silencing of *DELLA* induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *Plant Journal* 52: 865–876
- Medina, M.** (2010). Tesis Doctoral: Androesterilidad ligada a la obtención de frutos partenocárpicos en cultivares comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) In Departamento de Biotecnología (Valencia: Universidad Politécnica de Valencia).
- Medina, M., Roque, E., Pineda, B., Cañas, L., Rodríguez-Concepción, M., Beltrán, J. P., Gómez-Mena, C.** (2013). Early anther ablation triggers parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 11, pp 770-779.
- Mayerhofer, A., Lahr, G. and Gratzl, M.** (1991) Expression of the natural cell adhesion molecule in endocrine cell of the ovary. *Endocrinology*, 129, 792-800.
- Minoia, S., Petrozza, A., D’Onofrio, O., Piron, F., Mosca, G., Sozio, G., Cellini, F., Bendahmane, A., Carriero, F. (2010). A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Research Notes* 3:69–76.
- Moyano, E., Martínez-García, J. F. and Martín, C.** (1996). Apparent Redundancy in MYB gene function provides gearing for the Control of Flavonoids Biosynthesis in *Antirrhinum* flowers. *The Plant Cell* 8, 1519-1532.
- Muños, S., Ranc, N., Botton, E., et al.** (2011). Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. *Plant Physiology* 156, 2244–2254.

- Murray, J. A., Godin, C. and Trass, J.** (2012) Systems analysis of shoot apical meristem growth and development: integrating hormonal and mechanical signaling. *Plant Cell* 24, 3907-3919.
- Nitsch, L. M., Oplaat, C., Feron, R., Ma, Q., Wolters-Arts, M., Hedden, P., Mariani, C. and Vriezen, W. H.** (2009). Abscisic acid levels in tomato ovaries are regulated by *LeNCED1* and *SICYP707A1*. *Planta* 229(6):1335-1346.
- Noda, K., Glover, B. J., Linstead, P. and Martin, C.** (1994). Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature* 369, 661 -664.
- Ozga, J., and Reinecke, D.** (2003). Hormonal Interactions in Fruit Development. *Journal of Plant Growth Regulation* 22, 73-81.
- Pan, I. L., McQuinn, R., Giovannoni, J. J., and Irish, V. F.** (2010). Functional diversification of AGAMOUS lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. *Journal of Experimental Botany*. 61, 1795–1806.
- Pascual, L., Blanca, J. M., Cañizares, J., Nuez, F.** (2009). Transcriptomic analysis of tomato carpel development reveals alterations in ethylene and gibberellin synthesis during pat3/pat4 parthenocarpic fruit set. *BMC Plant Biology* 9:67.
- Pattison, R. J., and Catala, C.** (2012). Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the PIN and AUX/LAX gene families. *Plant Journal*. 70, 585–598.
- Pesaresi, P., Mizzotti, CH., Colombo, M., and Masiero, S.** (2014) Genetic regulation and structural changes during tomato fruit development and ripening. *Frontiers in plant Science*. April. Volume 5. Article 124.
- Pnueli, L., Hareven, D., Rounsley, S. D., Yanofsky, M. F., Lifschitz, E.** (1994). Isolation of the tomato *AGAMOUS* gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *The Plant Cell* 6, 163–173.
- Preston, J, Wheeler, J., Heazlewood, J., Li, S. F., Parish, R.W.** (2004). AtMYB32 is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 40(6):979-95.
- Rensink, W.A. & Buell, C. R.** (2005) Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends in Plant Science*. 10, 603-609.
- Roque, E., Gómez, M., Ellul, P., P., Wallbraun, M., Madueño, F., Beltrán, J.-P., and Cañas, L.** (2007). The PsEND1 promoter: a novel tool to produce genetically engineered male-sterile plants by early anther ablation. *Plant Cell Reports* 26, 313-325.
- Ross, J. J., O'Neill, D. P., Wolbang, C. M., Symons, G. M., and Reid, J. B.** (2001) Auxin-Gibberellin Interactions and their Role in Plant Growth. *Journal of Plant Growth Regulation* 20, 336-353.
- Serrani, J. C., Ruiz-Rivero, O., Fos, M., and García-Martínez, J. L.** (2008). Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant Journal*. 56 (6), 922-934.

- Silva, G. F. F. E., Silva, E. M. , Azevedo, M. D. S., Guivin, M. A. C., Ramiro, D. A., Figueiredo, C. R., Carrer, H., Peres, L. E. P., Nogueira, F. T. S.** (2014). microRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. *The Plant Journal* 78, 604–618.
- Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Angenent, G. C., Kaufmann, K.** (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development (Cambridge)* 139, 3081–3098.
- Srivastava, A. and Handa, A. K.** (2005). Hormonal regulation of tomato fruit development: A molecular perspective. *Journal of Plant Growth Regulation* 24, 67-82.
- Tikunov, Y. M., Molthoff, J., DeVos, R. C. H., Beekwilder, J., VanHouwelingen, A., VanderHooft, J. J. J., et al.** (2013). NON-smoky glycosyltransferase1 prevents the release of smoky aroma from tomato fruit. *Plant Cell* 25, 3067–3078.
- Tomato Genome Consortium.** (2012).The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485, 635–641.
- Trainotti, L., Tadiello, A., and Casadoro, G.** (2007). The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *Journal Experimental Botany*. 58, 3299–3308.
- Vimolmangkang, S., Han, Y., Wei, G., Korban, S. S.** (2013). An Apple MYB transcription factor, *MdMYB3*, is involved in regulation of anthocyanin biosynthesis and flower development. *BMC Plant Biology* 13:176.
- Vrebalov, J., Pan, I. L., Arroyo, A. J. M., et al.** (2009). Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *The Plant Cell* 21, 3041–3062.
- Vriezen, W. H., Feron, R., Maretto, F., Keijman, J., and Mariani, C.** (2008). Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist*. 177, 60–76.
- Wang, H., Jones, B., Li, Z., Frasse, P., Delalande, C., Regad, F., et al.** (2005). The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 17, 2676–2692.
- Yang, S., Sweetman, J. P., Amirsadeghi, S., Barghchi, M., Huttly, A. K., Chung, W. and Twell, D.** (2001). *Plant Physiology*, Vol. 126, pp. 1738-1753.
- Zambryski, P.** (1988) Basic processes underlying Agrobacterium-mediated DNA transfer to plant cells. *Annual Review Genetics* 22, 1-30.

VIII. GLOSARIO DE TÉRMINOS BOTÁNICOS:

- **pinnaticompuestas:** son las hojas que se estructuran de forma pinnada, es decir, hojas compuestas con numerosos foliolos a lo largo del raquis.
- **Imparipinnada:** poseen un último foliolo que remata el final del raquis, por lo que su número es impar.
- **Actinomorfa:** flor simétrica.
- **Epipétalo:** Androceo cuyos estambres nacen directamente sobre los pétalos de la corola.