



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL

Identificación y Caracterización de Mutantes de
Tomate (*Solanum Lycopersicum*) Afectados en el
Desarrollo Reproductivo y en la Tolerancia a
Estreses Abióticos.

D. Victoriano Meco Martínez

2015



Identificación y caracterización de mutantes de tomate (*Solanum lycopersicum*) afectados en el desarrollo reproductivo y en la tolerancia a estreses abióticos.

Tesis Doctoral

D. Victoriano Meco Martínez

Directores

Dra. María del Carmen Bolarín Jiménez

Dr. Francisco Borja Flores Pardo

2015

Resumen

El siglo XXI plantea un nuevo reto para la agricultura: las predicciones de aumento de la población mundial exigen aumentar la productividad de los cultivos. La incidencia del cambio climático sobre regiones históricamente agrícolas es causa ya del descenso en el rendimiento agrícola, al estar afectados por el impacto creciente de estreses abióticos como la sequía y la salinidad. Una de las estrategias para abordar este desafío es la generación y análisis de colecciones de mutantes de especies vegetales de gran importancia agro-alimentaria como tomate para la identificación de genes y la disección de mecanismos implicados en el desarrollo y la producción así como en la tolerancia a estreses abióticos. Dentro del programa de mutagénesis insercional con T-DNA en tomate que se lleva a cabo entre los grupos de investigación del IBMCP, UAL y CEBAS, en este trabajo nos hemos centrado en la identificación de mutantes afectados en el desarrollo reproductivo, que en último extremo afecta a la producción de fruto, y en la respuesta a la salinidad y la sequía, por ser estreses abióticos tan importantes por su incidencia en el rendimiento final. En el primer caso se aborda la identificación y caracterización de un mutante de gran interés agronómico por su fenotipo afectado en el desarrollo reproductivo, denominado *afs1* (*abnormal fruit set-1*). El mutante *afs1* se caracteriza por presentar una mayor tasa de cuajado de fruto, reflejada en un marcado aumento del número de frutos que, aunque de menor tamaño, promueven una mejora significativa de la producción. Entre las características de *afs1* cabe destacar que sus frutos son partenocárpicos y destacan por su mayor calidad debido a una mayor concentración de glucosa y fructosa, así como de ácido cítrico, que dan lugar a un incremento del índice de sabor. La mutación responsable de dicho fenotipo no se debe a una inserción de T-DNA si no a una mutación somaclonal generada durante la transformación y cultivo *in vitro*, algo ya observado en otras colecciones de mutantes insercionales, y se está procediendo a su localización genómica. En el segundo caso se aborda la caracterización de un mutante alterado en la respuesta al estrés salino e hídrico. El mutante se ha denominado *wak1* (*Wall-associated kinase 1*), ya que la mutación responsable ha sido etiquetada por un inserto T-DNA que se sitúa en la región promotora del gen

S/WAK1, que forma parte de un clúster génico de cuatro isoformas que están localizadas en el cromosoma 9, que codifican para unas proteínas quinasas asociadas a pared celular (cell wall-associated kinases). Aunque la expresión del gen *S/WAK1* está anulada en el mutante, no lo están sin embargo los genes flanqueantes *S/WAK2* y *S/WAK3*. El mutante *wak1* presenta un fenotipo similar a la planta no transformada cuando se cultiva sin estrés, muestra un fenotipo sutil en condiciones de estrés hídrico y salino a medio plazo, y finalmente reduce significativamente el rendimiento en términos de producción de fruto en estrés a largo plazo. A nivel fisiológico, el mutante *wak1* presenta mayor tolerancia al estrés iónico inducido por salinidad, con menor acumulación de Na⁺ en hoja. Sin embargo, el mutante es sensible al estrés osmótico inducido tanto por estrés salino como hídrico. Además, la anulación del gen *S/WAK1* provoca una acumulación de sacarosa en raíz, relacionada con una alteración en la expresión de genes implicados en el metabolismo de sacarosa. Considerados en conjunto, los resultados de la caracterización de estos mutantes fenotípicamente tan diferentes demuestran el gran interés que tiene el análisis de mutantes para avanzar en el conocimiento de los procesos y los genes clave en el desarrollo y en la tolerancia a estreses abióticos.

Abstract

The XXI century poses new challenges to agriculture: the predictions of global population growth invite us to focus all our efforts on increasing crop yields. In turn, the impact of climate change on historically farming regions promotes the decrease of the performance of these vegetable species with high agronomic interest, such as the tomato, which is one of the most important global vegetable species. Among the strategies proposed to address the problems exposed, generating mutant collections is one of the most widespread strategies and it has provided much information about processes, pathways and relevant mechanisms. To this end, a collection of insertional mutants using an enhancer trapping has been created in the commercial cultivar of the tomato "Moneymaker" and we have directed our interest in selecting mutants affected in the reproductive development and in the response to abiotic stresses (salinity and drought) to be key processes that directly affect the final crop yield. Within the collection, we have identified a mutant with high agronomic interest related to reproductive development, which we have named *afs1* (*abnormal fruit set-1*), characterized by an increased vegetative growth rate and higher rate of fruit set. Their flowers show an opening in the base of the stamen caused by the early fruit set, initiated before the anthesis. The higher fruit set rate is reflected in the increase in fruits number, despite the smaller size, leading to a significant improvement in the production and final yield in greenhouse conditions. Among the characteristics of production, it is noteworthy that this *afs1* produces parthenocarpic fruits with improved organoleptic characteristics, brought about by an increase in glucose and fructose, and citric acid therefore, leads to an increased rate of flavor. It has also been selected and characterized by a mutant response to salt and water stresses, named *wak1* (*Wall-associated Kinase 1*) which carries a T-DNA inserted in the promoter region for canceling the *SIWAK1* gene expression in the mutant. This gene is part of a gene cluster consisting of four total *WAK* isoforms genes in chromosome 9. qPCR expression analysis has indicated that the *SIWAK1* expression is root specific and reduces its expression levels in response to salt stress. The two flanking *SIWAK1* isoforms genes (referred to *SIWAK3* and *SIWAK2* in this paper) are not affected by

the T-DNA insertion and have a similar pattern to the described for *S/WAK1* response. At a phenotypic level, this mutant has a WT phenotype in standard culture conditions and displays a subtle phenotype under water and salt stresses, characterized by a significant reduction in the height rate of the aerial part, and the reduction of shoot water content. Paradoxically, despite the reduction in development, salt stress experiences have shown that the *wak1* mutant has an increased tolerance to the accumulation of toxic concentrations of Na⁺ in the shoot. Furthermore, it has been shown that this mutant is sensitive to osmotic effect, which occurred in both the water stress and in the first phase of the salt stress. The results indicate that the basis of this sensitivity is an alteration in osmotic adjustment ability and in the sugar metabolism promotes an increased sucrose transport to the root at the expense of the growth rate and the transport of water toward the apex.

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	III
ÍNDICE	V
ABREVIATURAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVI
ÍNDICE DE TABLAS	XXII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Introducción	1
1.1. Agricultura y Estrés Abiótico.....	1
1.2. Descripción botánica.....	3
1.3. Breve introducción histórica del cultivo del tomate.....	5
1.4. Importancia económica del cultivo de tomate	6
2. Desarrollo vegetativo y reproductivo en Tomate	8
2.1. Etapas fenológicas del tomate.....	8
2.2. Morfología de la planta y hábito de crecimiento.....	10
2.3. Morfología de la flor	11
2.4. Polinización y fecundación en tomate.....	11
2.5. Cuajado y desarrollo del fruto	12
2.6. Morfología del fruto.....	15
2.7. Composición del fruto	16
2.8. Calidad organoléptica y nutricional del tomate: su importancia como alimento funcional.....	17
3. Desarrollo del fruto en ausencia de fecundación: Partenocarpia.....	18
3.1. La Partenocarpia natural o espontánea	20
3.2. Partenocarpia mediante aplicación de fitorreguladores	22
3.3. Partenocarpia mediante transgénesis	23
3.4. Regulación hormonal y génica en la partenocarpia.....	24

3.5. Genes implicados en la regulación de Auxinas cuya alteración induce la formación de frutos partenocárpicos.....	24
3.6. Genes implicados en la regulación de Giberelinas cuya alteración induce la formación de frutos partenocárpicos	29
3.7. Genes relacionados con la síntesis de ABA.....	30
4. El Impacto de la salinidad y la sequía en la agricultura	31
4.1. Respuesta al estrés osmótico inducido por salinidad y sequía	33
4.2. Respuesta al estrés iónico inducido por salinidad	36
4.3. Genes implicados en el transporte iónico.....	37
5. La familia Wall-Associated Kinase (WAK) y su papel en procesos de desarrollo y tolerancia a estrés.....	41
5.1. Papel de los genes WAKs en la tolerancia a estrés biótico y abiótico.....	43
6. Colecciones de mutantes como herramienta genómica para la identificación de genes implicados en la respuesta a estrés abiótico	45
6.2. La mutagénesis insercional: el etiquetado de los genes mutados.....	47
6.3. Etiquetado mediante trapping	48
II. OBJETIVOS	57
III. MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. Material vegetal.....	61
2. Construcción usada para la transformación	61
3. Multiplicación y mantenimiento in vitro de líneas T-DNA de tomate	62
4. Test de selección por tolerancia a kanamicina	63
4.1. Test de kanamicina con semillas.....	63
4.2. Test de Kanamicina por vaporización directa sobre foliolo	64
5. Análisis histoquímico de la expresión del gen delator uidA	65
6. Métodos y técnicas utilizadas en el cultivo in vitro.....	66
6.1. Medios de Cultivo utilizados	66
6.2. Cultivo in vitro de semillas	66

6.3. Condiciones de la cámara de cultivo in vitro	67
6.4. Aclimatación.....	67
7. Obtención de progenies TG2 e identificación de homocigotos en TG3	67
8. Métodos y técnicas de cultivo in vivo	68
8.1. Cultivo de plantas en cámara en condiciones controladas (CCC)	68
8.2. Cultivo en sustrato	69
8.3. Sistema dos a dos en sustrato para ensayos de estrés hídrico.....	70
8.4. Cultivo en sistema hidropónico.....	70
8.5. Cultivo en condiciones de invernadero.....	72
9. Evaluación de las características fenotípicas	74
9.1. Evaluación de caracteres de desarrollo vegetativo y reproductivo.....	75
10. Obtención de extractos para los análisis fisiológicos.....	75
10.1 Por digestión.....	75
10.2 Por centrifugación: Obtención de un extracto crudo fresco	76
10.3 Por liofilización	76
11. Determinación de parámetros fisiológicos.....	77
11.1 Incremento en longitud.....	77
11.2. Relaciones hídricas.....	77
11.2.1. Contenido de agua	77
11.2.2. Potencial Osmótico	77
11.2.3. Potencial hídrico.....	78
11.2.4. Potencial de turgor o Turgencia.....	79
11.3 Estimación de la integridad de las membranas celulares mediante la determinación de la salida, pérdida o fuga de electrolitos	79
11.4. Tasa fotosintética (Pn) o tasa de asimilación de CO ₂ (A), tasa de transpiración (E) y conductancia estomática (gs).....	80
11.5. Medida de la tasa de transpiración pasiva	81
11.6. Contenido de clorofila.....	81

11.7. Determinación de Cationes.....	82
12. Evaluación del desarrollo reproductivo y sus características	82
12.1. Evaluación de la tasa de cuajado	82
12.2. Evaluación de la producción.....	82
12.3. Evaluación de la partenocarpia	82
12.4. Tiempo de floración.....	83
12.5. Densidad y viabilidad del polen	83
12.6. Evaluación del efecto sobre el cuaje de fruto de la emasculación y la polinización manual	83
12.7. Aplicación hormonas vegetales.....	84
13. Técnicas de microscopía óptica.....	85
13.1 Inclusión en resina Spurr para la observación microscópica de ovarios.....	85
13.2. Inclusión en JB4 para la observación microscópica de pericarpo de fruto.....	86
14. Análisis de calidad de fruto.....	88
14.1 Etileno y actividad respiratoria	88
14.2. Medida de la firmeza.....	89
14.3. Contenido en sólidos solubles totales	89
14.4. Medida de la acidez valorable.....	90
14.5. Índice de Maduración.....	90
14.6. Determinación de azúcares y ácidos orgánicos	90
14.7. Determinación de aminoácidos libres	91
15. Ensayo de conservación postcosecha de frutos	92
15.1. Método de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) para la determinación del índice de peroxidación de lípidos en fruto de tomate, expresado mediante la producción de malonil-dialdehído (MDA)	93
16. Métodos de Biología Molecular	94
16.1. Extracción DNA genómico.....	94
16.2. Cuantificación de Ácidos nucleicos (DNA y RNA).....	95

16.3. Amplificación por PCR.....	95
16.4. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	96
16.5. Genotipado	96
16.6. Extracción de RNA total	99
16.7. Síntesis de cDNA	99
16.8. PCR cuantitativa en tiempo real	99
17. Tratamiento estadístico	101
IV. CAPÍTULO I: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE DE TOMATE <i>afs1</i> AFECTADO EN EL DESARROLLO REPRODUCTIVO.....	105
Resultados	105
1. Identificación del mutante de tomate <i>afs1</i> (<i>abnormal fruit set 1</i>).....	105
1.1. Detección de un fenotipo mutante afectado en el desarrollo reproductivo	105
1.2. Análisis genético del mutante <i>afs1</i>	106
1.3. Análisis molecular del mutante <i>afs1</i>	108
1.4. El análisis de cosegregación genotipo-fenotipo revela que la inserción T DNA detectada en el genoma de <i>afs1</i> no es la causante de la mutación responsable del fenotipo	111
1.5. Selección de una línea homocigota para el fenotipo de interés y acigota para el inserto de T-DNA para la caracterización de <i>afs1</i>	112
2. Caracterización fenotípica del mutante <i>afs1</i>	114
2.1. <i>afs1</i> presenta una mayor tasa de crecimiento vegetativo en nº de hojas y reproductivo en términos de nº de inflorescencias y de flores por inflorescencia	114
2.2. La producción de fruto aumenta de manera manifiesta en las inflorescencias <i>afs1</i> , dando lugar a frutos de menor tamaño y partenocárpico	118
2.3. El cuajado de fruto partenocárpico en <i>afs1</i> ocurre de forma independiente de la polinización.....	121
2.4. La partenocarpia en <i>afs1</i> no se debe a malformaciones en la estructura de la flor	124

2.5. El desarrollo floral en <i>afs1</i> no está sincronizado y se caracteriza por un engrosamiento del ovario y un cuaje de fruto sin que se produzca la senescencia y abscisión de pétalos y cono estaminal de la flor.....	127
2.6. Los frutos <i>afs1</i> presentan un desarrollo similar a los frutos WT tratados con auxinas y giberelinas	130
2.7. Un factor medioambiental modula la expresión del fenotipo mutante <i>afs1</i>	134
2.8. Análisis de calidad de fruto. Los frutos <i>afs1</i> presentan un menor contenido en agua que se traduce en una mayor concentración de solutos como azúcares reductores y ácidos orgánicos.....	136
2.9. La capacidad de conservación postcosecha de frutos <i>afs1</i> se ve negativamente afectada.....	140
3. Mapeo posicional de la mutación <i>afs1</i>	144
3.1. Generación y fenotipado de la población híbrida segregante necesaria para el análisis genómico GWA y mapeo por clonaje posicional.....	144
3.2. Re-secuenciación de genomas de las poblaciones seleccionadas F2.....	148
4. Discusión	151
4.1. El rasgo de partenocarpia provocada por la mutación <i>afs1</i> se comporta como un carácter monogénico recesivo.....	151
4.2. Efectos sobre el desarrollo vegetativo y reproductivo de la mutación <i>afs1</i>	153
4.3. La mutación provoca partenocarpia asociada a una mejora del rendimiento.....	155
4.4. El cuaje de fruto <i>afs1</i> tiene lugar prematuramente y su desarrollo está desacoplado con respecto a la evolución normal de la flor.....	158
4.5. Morfología de la flor e inicio del cuajado	160
4.6. El desajuste hormonal como potencial causante de la partenocarpia en <i>afs1</i>	164
4.7. El factor ambiental en la partenocarpia.....	166
4.8. Calidad y conservación de frutos <i>afs1</i>	166
4.9. La obtención de líneas híbridas F2 resultado del cruce del mutante <i>afs1</i> con el ecotipo <i>Solanum pimpinellifolium</i> LA1589 corrobora el carácter monogénico y recesivo de la mutación <i>afs1</i>	169
4.10. Interés agronómico y biotecnológico del mutante <i>afs1</i>	172

V. CAPÍTULO II: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE <i>wak1</i>	
AFECTADO EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS SALINO	177
Resultados	177
1. Identificación y caracterización molecular del mutante <i>wak1</i> (<i>Wall-Associated Kinase</i>).....	177
2. Estudio de co-segregación fenotipo-genotipo. Identificación de líneas Homocigotas para el inserto de T-DNA.....	179
3. El gen <i>S/WAK1</i> se expresa en raíz y reduce su expresión con la salinidad en el cultivar MoneyMaker.....	182
4. El gen <i>S/WAK1</i> está anulado en el mutante pero no los genes flanqueantes <i>S/WAK2</i> y <i>S/WAK3</i>	184
5. El mutante <i>wak1</i> muestra un fenotipo sutil cuando el estrés salino se aplica a corto-medio plazo pero a largo plazo reduce el rendimiento en fruto.....	186
6. La acumulación de Na ⁺ y la relación Na ⁺ /K ⁺ se reducen en las hojas jóvenes del mutante <i>wak1</i> en condiciones salinas.....	189
7. El mutante <i>wak1</i> muestra menor tolerancia al estrés osmótico inducido por la salinidad	192
8. La respuesta del mutante <i>wak1</i> al estrés hídrico confirma su menor tolerancia al estrés osmótico.....	195
9. La reducción de la tasa de desarrollo <i>in vitro</i> del mutante <i>wak1</i> está relacionada con la concentración de sales en el medio de cultivo.....	199
10. El papel del gen <i>S/WAK1</i> en la respuesta a estrés está relacionado con una acumulación de sacarosa en raíz.....	201
11. Discusión	207
11.1. La anulación del gen <i>S/WAK1</i> no afecta al desarrollo vegetativo ni reproductivo cuando las plantas se cultivan sin estrés	209
11.2. El gen <i>S/WAK1</i> está involucrado en la tolerancia del tomate a la salinidad.....	210
11.3. El mutante <i>wak1</i> es tolerante al estrés iónico inducido por salinidad.....	211

Índice

11.4. El mutante <i>wak1</i> es sensible al estrés osmótico inducido por salinidad y sequía	212
11.5. El gen <i>S/WAK1</i> está implicado en el metabolismo de la sacarosa en raíz.....	214
VI. CONCLUSIONES.....	221
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	225

Abreviaturas

cv	cultivar
pt	patovar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
gDNA	Acido desoxirribonucleico genómico
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
TG(1)	(Primera) generación de plantas transgénicas
ETMM	Línea de MM con trampa de intensificadores
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro sódico
<i>nptII</i>	Gen de la neomicinfosfotranferasa II
<i>uidA</i>	Gen de la β -glucuronidasa
X-gluc	Sustrato de la glucuronidasa
MM	Cultivar monemaker
WT	Especie silvestre
pb	Pares de bases
Kb	Kilo bases
ABA	Ácido abscísico
CK	Citoquinina
JA	Jasmonato
GA	Giberelina
C ₂ H ₄	Etileno
gs	Conductancia estomática
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
rpm	revoluciones por minuto
μ m	Micro moles
m	Metros
m ²	metros cuadrados
M	Molar
cm	Centímetros
d	Día
h	hora
DAA	Días antes de antesis

Abreviaturas

DDA	Días después de antesis
min	Minutos
s	Segundos
v	Voltios
Kv	KiloVoltios
CO ₂	Dióxido de carbono
KCl	Cloruro potásico
nm	Nanometros
kg	Kilogramos
L	Litros
mL	Mililitros
dS	Decisiemens
CE	Conductividad eléctrica
mOsmol	MiliOsmoles
bar	bares de presión
MPa	Milipascales
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RT	Retrotranscripción
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
QTL	Quantitative Trait Loci
HPLC	High Pressure Liquid Cromatography
HPLC-MS	High Pressure Liquid Cromatography-Mass Spectrometry
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry
SNP	Single Nucleotide Polimorfism
ψ	Potencial
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
SB	Sodio-ácido Bórico (tampón)
EMS	Etilmetil sulfonato
ROS	Reactive Oxigene Species
Lc	Lucifersase

Índice de figuras	XV
Figura 1. Ranking mundial de producción de tomates.....	7
Figura 2. Producción agro-pecuaria en España	7
Figura 3. Etapas fenológicas del tomate.....	9
Figura 4. Comparación e identificación de las diferentes estructuras en la flor y el fruto del tomate	14
Figura 5. Desarrollo del fruto de tomate.....	15
Figura 6. Corte transversal y longitudinal de un fruto de tomate bilocular.....	16
Figura 7. Aspectos generales de la regulación hormonal y génica en el desarrollo de la flor y el fruto en tomate.....	26
Figura 8. Síntesis, vías de transporte y mecanismos de degradación de la sacarosa.....	35
Figura 9. Principales proteínas y mecanismos de transporte que facilitan la homeostasis intracelular de Na ⁺ a niveles altos de Na ⁺	40
Figura 10. Esquema de la construcción genética utilizada en la transformación de tomate para generar la colección de mutantes insercionales	62
Figura 11. Esquema del proceso de transformación genética, regeneración y selección de transformantes y obtención de plantas TG1 para aclimatar y obtener semillas y evaluar el fenotipo.....	63
Figura 12. Test de kanamicina	64
Figura 13. Tinción GUS positiva en diferentes tejidos	65
Figura 14. Sistema dos a dos para la evaluación de la respuesta a estrés hídrico en plantas de tomate (WT vs mutante).....	70
Figura 15. Aspecto general de las plantas de tomate en cultivo hidropónico.....	71
Figura 16. Aspecto general del sistema de riego por depósitos y del invernadero donde se han realizado los experimentos a largo plazo de estrés salino e hídrico de tomate.....	73

Figura 17. Patrón de segregación mendeliano esperado para líneas con mutación monogénica.....	74
Figura 18. Imágenes del equipo CIRAS-2 de PP systems	81
Figura 19. Programa de ciclos de reacción de la PCR.....	96
Figura 20. Esquema de funcionamiento de la técnica para el genotipado	97
Figura 21. Esquema de las regiones amplificadas por los cebadores utilizados en la tabla 17	98
Figura 22. Programa de ciclos de reacción de la qPCR.....	100
Figura 23. Identificación del mutante <i>afs1</i>	106
Figura 24. Análisis molecular del mutante <i>afs1</i>	109
Figura 25. Localización genómica de la inserción de T-DNA localizada en el plantas TG1 del mutante <i>afs1</i>	111
Figura 26. Resultados de BLASTX para el unigene SGN-U570174	111
Figura 27. Principales rasgos fenotípicos de la línea <i>afs1</i>	115
Figura 28. Evolución temporal del nº de hojas por planta (A); del nº de inflorescencias por planta (B); del número promedio de órganos florales por planta (C); tasa de cuaje expresado en nº de frutos por nº de órganos florales (D) y número promedio de frutos cuajados por planta (E).....	117
Figura 29. Análisis de la producción en la línea <i>afs1</i> con respecto a WT: número de frutos obtenidos (A) y el peso promedio del fruto (B).....	118
Figura 30. Análisis de la producción por inflorescencia en la línea <i>afs1</i> con respecto a WT: número de frutos total (A) y peso promedio del fruto (B).....	119
Figura 31. Análisis de la producción: Peso total de los frutos recolectados por planta.....	120
Figura 32. Análisis de la producción: Recuento de semillas por fruto.....	120
Figura 33. Evaluación de la densidad y viabilidad del polen	123
Figura 34. Flor WT y <i>afs1</i> indicando sus diferentes partes anatómicas.....	124

Figura 35. Análisis de la morfología y estructura de la flor <i>afs1</i> comparado con WT.....	126
Figura 36. Evolución del desarrollo de la flor y del fruto en WT	128
Figura 37. Evolución morfológica para los diferentes estadios reconocidos en el desarrollo de la flor y fruto en el mutante <i>afs1</i> hasta justo antes de la maduración	129
Figura 38. Análisis cronológico del desarrollo floral en <i>afs1</i> comparado con WT	130
Figura 39. Comparación entre frutos en estado verde inmaduro procedentes de flores sometidas a tratamiento hormonal.....	132
Figura 40. Comparación de cortes histológicos a nivel microscópico del pericarpio de fruto verde inmaduro WT, WT tratado con GA ₃ , WT tratado con IAA, y <i>afs1</i>	133
Figura 41. Incidencia del factor ambiental en el fenotipo.....	135
Figura 42. Frutos recolectados para análisis de calidad	137
Figura 43. Ensayo de conservación a temperatura ambiente (A1 y A2) y a bajas temperaturas (B1 y B2), con reacondicionamiento posterior a temperatura ambiente (C1 y C2) de frutos <i>afs1</i> y WT.....	142
Figura 44. Grado de peroxidación de lípidos de los frutos <i>afs1</i> y WT sometidos a conservación a bajas temperaturas con reacondicionamiento a temperatura ambiente.....	143
Figura 45: Fenotipado visual: Imágenes de flores de plantas F1 (izquierda), F2 con fenotipo WT (centro) y F2 con fenotipo <i>afs1</i> (derecha).....	146
Figura 46. Análisis Southern Blot y localización genómica del inserto de T-DNA indica la presencia de un único inserto para un gen tipo <i>Wall-Associated Kinase (WAK)</i>	179
Figura 47. La inserción clonada (<i>WAK</i>) cosegrega con <i>nptII</i> pero no con el fenotipo albino.....	180
Figura 48. Esquema de identificación de la línea mutante, homocigota para la mutación <i>S/WAK1</i>	181

Figura 48. Patrón de expresión espacial de expresión para <i>S/WAK1</i>	182
Figura 50. Expresión relativa del gen <i>S/WAK1</i> y los genes flanqueantes <i>S/WAK2</i> y <i>S/WAK3</i> en raíces de plantas WT durante 24 h de tratamiento salino (100 mM NaCl)	183
Figura 51. Expresión relativa del gen <i>S/WAK1</i> y los genes flanqueantes <i>S/WAK2</i> y <i>S/WAK3</i> en raíces de plantas WT y del mutante <i>wak1</i> durante 8 días de tratamiento salino (200 mM NaCl)	185
Figura 52. El mutante <i>wak1</i> muestra un fenotipo sutil en condiciones de salinidad a medio plazo aunque reduce la clorosis de las hojas superiores	187
Figura 53. El efecto negativo inducido por la salinidad en el mutante <i>wak1</i> se refleja principalmente en el rendimiento en fruto	188
Figura 54. La acumulación de Na ⁺ y la relación Na ⁺ /K ⁺ se reduce en hojas jóvenes del mutante <i>wak1</i> en condiciones salinas.....	190
Figura 55. La hoja joven del mutante <i>wak1</i> muestra una mayor deshidratación y menor reducción del potencial osmótico desde los primeros días de estrés salino	193
Figura 56. El mutante <i>wak1</i> es sensible al estrés osmótico inducido por la salinidad	194
Figura 57. El mutante <i>wak1</i> es sensible al estrés osmótico inducido por estrés hídrico	196
Figura 58. La mayor deshidratación de las hojas del mutante <i>wak1</i> está asociada al menor turgor de las plantas sometidas a estrés hídrico.....	198
Figura 59. La mutación <i>S/WAK1</i> no altera la pérdida de agua vía transpiración en condiciones de estrés hídrico.....	199
Figura 60. La reducción de la tasa de desarrollo <i>in vitro</i> del mutante <i>wak1</i> está relacionada con la concentración de sales del medio de cultivo pero no con la presencia o ausencia de sacarosa	200

Figura 61. El mutante *wak1* muestra una alta acumulación de sacarosa en raíz y una importante reducción de inositol en hoja joven en condiciones de salinidad 202

Figura 62. Análisis de expresión de genes implicados en el metabolismo de la sacarosa en raíces de plantas WT y mutante desarrolladas durante 5 días de tratamiento salino (200 mM NaCl) 203

Figura 63. Funciones de las proteínas implicadas en la señalización y el desarrollo relacionados con la pared celular. 215

Índice tablas	XXI
Tabla 1. Producción nacional de superficie, rendimiento y producción.....	8
Tabla 2. Composición del fruto de tomate maduro	17
Tabla 3. Compuestos y concentraciones del reactivo X-Gluc para el ensayo GUS	65
Tabla 4. Medio básico utilizado para la germinación de semillas	66
Tabla 5. Condiciones de cultivo en cámara de cultivo CCC.....	68
Tabla 6. Composición de las soluciones nutritivas que componen la disolución Hoagland utilizada para el cultivo de plantas en CCC.....	69
Tabla 7. Composición para la solución nutritiva utilizada para la fertirrigación en invernadero.....	74
Tabla 8. Caracteres evaluados para identificar fenotipos mutantes de desarrollo vegetativo y reproductivo, y para determinar la tasa de crecimiento comparando condiciones de control vs. estrés en las líneas mutantes ensayadas	75
Tabla 9. Cruces y objetivos llevados a cabo durante la evaluación del efecto ocasionado por procesos de polinización manual dirigida.....	84
Tabla 10. Condiciones de trabajo para HPLC	91
Tabla 11. Composición de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR.	95
Tabla 12. Cebadores usados para la amplificación de las secuencias <i>nptII</i> y <i>uidA</i>	95
Tabla 13. Cebadores utilizados para determinar la presencia del T-DNA y las regiones flanqueantes del vector pD991.....	98
Tabla 14. Cebadores utilizados para el genotipado de poblaciones de los mutantes 232ETMM (<i>wakI</i>) y 448ETMM (<i>afsI</i>).....	98
Tabla 15. Reactivos, volúmenes y concentraciones utilizado en la qPCR.....	99
Tabla 16. Cebadores para PCR cuantitativa en tiempo real utilizados para la cuantificación de la expresión de los genes de interés.....	101
Tabla 17. Análisis genético del mutante <i>afsI</i>	107

Tabla 18. Análisis de cosegregación fenotipo-genotipo en una población TG2 del mutante <i>afs1</i>	113
Tabla 19. Resultados de nº de frutos cuajados y de semillas en las operaciones de (A) emasculación; (B) autopolinización (<i>afs1</i> y WT), y (C) retrocruce <i>afs1</i> × WT.	121
Tabla 20. Cuajado y recolección de semillas para los tratamientos hormonales	131
Tabla 21. Análisis de calidad en fruto.....	138
Tabla 22. Análisis del perfil metabólico de la pulpa de fruto <i>afs1</i> y WT: azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos libres y composición mineral.....	139
Tabla 23. Análisis genético de la población F2 para el fenotipo WT vs <i>afs1</i>	145
Tabla 24. Poblaciones de plantas F2 seleccionadas por aparición del fenotipo <i>afs1</i> o no (fenotipo WT) para el estudio GWA y mapeo posicional.....	147
Tabla 25. La expresión relativa de los principales genes implicados en el transporte de Na ⁺ desde la raíz a la parte aérea no se ve afectada en el mutante <i>wak1</i> en condiciones salinas.....	191

Introducción

1. Introducción

1.1. Agricultura y Estrés Abiótico

El inicio de la agricultura (del latín agri “campo” y cultura “cultivo, crianza”) se ha datado en el periodo Neolítico en las sociedades desarrolladas que habitaban en la región conocida como la Luna Creciente Fértil (una región geográfica que se corresponde con parte de los territorios del Antiguo Egipto, el Levante Mediterráneo, Mesopotamia y Persia) y como actividad económica rápidamente tomó una gran importancia estratégica como base fundamental para el desarrollo autosuficiente y la generación de riqueza.

Históricamente, la fertilidad de las tierras y los avances tecnológicos en la agricultura han estado íntimamente ligados al desarrollo y bienestar de la civilización. De hecho, el desarrollo de la agricultura ha sido uno de los pilares fundamentales que permitieron la transición demográfica desde índices de mortalidad elevados a manifiestamente bajos. Esta transición demográfica se acentuó durante el siglo XX, periodo en el cual la población mundial se ha estimado que ha aumentado un 50% en la primera mitad del siglo y un 140% en la segunda mitad.

El descubrimiento a principios del siglo XX del proceso Haber-Bosch para producir amoníaco a partir de nitrógeno e hidrógeno gaseosos constituyó la base de una revolución en la producción de fertilizantes. El uso de abonos químicos (como los nitratos producidos a partir de la oxidación del amoníaco industrial lo que terminó con la dependencia del guano), la mecanización y los estudios científicos en edafología e ingeniería agrícola transformaron la agricultura, a finales del siglo XIX y principios del XX, en una actividad similar a la industrial (Smil, 2004). No obstante, la dependencia de la climatología y la periódica irrupción de plagas (hambre irlandesa de 1845-1849 debido a la plaga de roya que afectó catastróficamente a la producción de la patata, o la plaga de filoxera que desde 1863 afectó gravemente al cultivo de la vid) produjeron periódicas crisis agrícolas. La segunda mitad del siglo XX significó un salto cualitativo en la producción agrícola en todo el mundo, debido a la introducción de nuevas variedades enanas

I. Introducción

pero de alto rendimiento en especies que constituían la base alimentaria de grandes regiones del mundo, como el trigo y el arroz, proceso conocido como la Revolución Verde (McGuire, 2013). Ya a finales de siglo XX, la agricultura ha experimentado un nuevo impulso con la introducción de nuevas aplicaciones en biotecnología, siempre con el fin de aumentar el rendimiento de los cultivos. Simultáneamente, la evolución generalizada hacia una agricultura de mercado conllevó una mayor dependencia de los plaguicidas y el abonado intensivo, generando graves problemas medioambientales como la contaminación de suelos y acuíferos.

Se ha pasado de una situación en la que el hombre ha tratado de cultivar plantas en áreas con las mejores condiciones climáticas y edáficas a una situación donde el cultivo se desarrolla en suelos, aguas y climas en los que frecuentemente se producen situaciones de estrés, todo esto forzado por el constante aumento de la presión demográfica y la idea de no tener que depender de otras naciones en cuanto al aprovisionamiento. Esas mismas razones han llevado a cultivar determinadas especies de interés agrícola en ambientes que están lejos de ser los más adecuados para su desarrollo. Por ello, las situaciones de estrés son tan comunes en los sistemas agrícolas y de ahí la importancia de su conocimiento y manejo.

La seguridad alimentaria se ha convertido en un punto principal de la agenda política tanto de Estados como de Organizaciones Internacionales y se considera un objetivo clave para promover el desarrollo económico global y la estabilidad socio-política. La importancia crítica de este objetivo se ha incrementado recientemente debido a dos factores: demografía y cambio climático. Se espera un aumento en la población mundial desde los actuales 7.100 millones a más de 9.500 millones en 2050 (ONU, 2012), lo que significa que la humanidad se tiene que enfrentar a un incremento manifiesto de la demanda alimentaria. El cambio climático constituye una amenaza creciente en la producción de alimentos. Se predice que la temperatura de la superficie terrestre va a aumentar en todos los escenarios considerados de emisión de CO₂ a lo largo de este siglo (Rosenzweig and Parry, 1994). En el aspecto específico de la producción agrícola se prevé que el

cambio climático va a producir un impacto negativo para aumentos de temperatura por encima de los 2°C de finales del siglo XX si no se logra una adaptación de las especies de interés agronómico a estas nuevas condiciones medioambientales. Íntimamente relacionado con este cambio climático se predice una reducción en los recursos hídricos tanto de superficie como subterráneos lo que provocará un aumento en la competición por su suministro (IPCC, 2014).

En la producción agrícola en tierras áridas y semiáridas, que representan aproximadamente un tercio de la superficie del planeta y poblada por aproximadamente 400 millones habitantes (Williams, 1999), el escenario descrito sobre el cambio climático se traduce en una mayor tasa de evaporación que conduce a una creciente escasez de agua y mayor acumulación de sales en la superficie de los suelos, que afecta gravemente al rendimiento agrícola y a la calidad de los productos de origen vegetal. En el caso particular de la salinidad la situación ha empeorado de forma alarmante ya que el problema no sólo parte de la existencia de vastas áreas de suelos salinos sino también de los procesos de salinización secundaria derivados del uso de agua de baja calidad para irrigación y de prácticas de agricultura intensiva que se aplican hoy en día (Munns and Tester, 2008).

1.2. Descripción botánica

El tomate, la segunda hortícola en importancia agrícola en cuanto a área de cultivo y producción en el mundo después de la patata (FAO, 2012) pertenece a la familia de las solanáceas, que contiene más de 3.000 especies, incluyendo muchas plantas de importancia económica incluidas patata, berenjena, petunia, tabaco, pimiento (*Capsicum*) y *Physalis*. *Solanum* es el género más grande de la familia de las solanáceas, que abarca hasta 1700 especies. Las especies del género *Solanum* están presentes en todas las regiones templadas y tropicales del planeta y se caracterizan por su gran diversidad morfológica y ecológica.

I. Introducción

Desde el punto de vista botánico, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es un fruto de baya y no un vegetal (hortícola de hoja). A lo largo de la historia se han realizado diferentes descripciones del género desde que por primera vez lo hiciera Carl von Linné en 1753. Una descripción muy interesante de la especie es la realizada por (Rick, 1960) que propuso una clasificación del tomate basándose en la capacidad de las especies silvestres para cruzarse con el tomate cultivado o domesticado. Reconoció nueve especies de tomates silvestres divididos en dos grandes grupos según su capacidad de cruce: los complejos *esculentum* y *peruvianum*. Todas las especies del complejo *esculentum* (*L. esculentum*, *L. pimpinellifolium*, *L. cheesmaniae*, *Lycopersicon pennellii*, *L. hirsutum*, *Lycopersicon chmielewskii* y *Lycopersicon parviflorum*) se pueden hibridar con el tomate cultivado y representan fuentes potenciales de resistencia al estrés biótico y abiótico, así como otros caracteres deseables; las especies del complejo *peruvianum* (*Lycopersicon chilense* y *L. peruvianum*) son muy diversos y representan un potencial real para el mejoramiento de cultivos (revisado en Bergougnoux, 2014).

En 1753, Carl von Linné clasificó por primera vez a los tomates dentro del género *Solanum*, nombrándolo esta vez como *Solanum lycopersicum* (Linnaeus, 1753). Debido a su estrecho parentesco con plantas venenosas del género *Solanum* como belladona y mandrágora Philip Miller propone en 1754 clasificar al tomate en el género *Lycopersicon* y la especie *esculentum*, con el fin de ayudar a aceptar a dicha especie como comestible (Miller, 1754).

Sin embargo, esta clasificación ha estado sujeta a debate durante largo tiempo, siendo así que finalmente se ha aceptado como denominación botánica definitiva del tomate la propuesta por Karl Linneo gracias al uso de las modernas herramientas moleculares a finales del siglo pasado. Éstas revelaron la suficiente información a nivel genómico que permitió la revisión de la clasificación filogenética de las *Solanaceae*. A partir de ese momento, el género *Lycopersicum* se reintrodujo dentro del género *Solanum* en la sección de *Lycopersicon* tal y como la había clasificado Linneo 200 años antes (Peralta et al., 2005, Foolad, 2007, Asamizu and Ezura, 2009).

1.3. Breve introducción histórica del cultivo del tomate

El origen de la domesticación del tomate todavía no está claro y existen dos hipótesis en discusión: la peruana y la mexicana.

En un intento de resolver esta cuestión, (DeCandolle, 1886) utiliza un enfoque que combina la botánica, la arqueología, la paleontología, la historia y la filología. Tras su estudio, DeCandolle concluye localizando el origen de la domesticación del tomate en Perú. Sus conclusiones se basaron en el hecho de que: i) no se identificaron registros naturales inequívocos de tomate de las Américas después de su descubrimiento europeo, ii) "mala peruviana" y "Pomi del Perú" son términos que se utilizan para referirse al tomate, lo que sugiere su domesticación y el transporte desde el Perú a Europa, iii) el tomate domesticado se cree que procede del tomate Cherry (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* L.), cuya localización geográfica se extiende desde la costa del Perú hasta el Sudoeste de EE.UU, iv) la distribución del tomate cultivado y sus progenitores surgieron de Perú por dispersión no controlada, v) la domesticación se produjo antes del descubrimiento de América, (revisado en (Peralta et al., 2007)).

El origen de la domesticación mexicana del tomate fue propuesto por (Jenkins, 1948). Se justifica principalmente por el hecho de no disponer de pruebas de su cultivo en la América del Sur precolombina, en comparación con las evidencias que localizan su domesticación en México. Sobre la filología, Jenkins también argumentó que el nombre "tomate" proviene de la palabra náhuatl "tomatl" mexicano, que se refiere a "las plantas dando frutos globosos y jugosos" (Bauchet and Causse, 2012). Sin embargo hasta la fecha, el origen de la domesticación del tomate está sin resolver totalmente, a pesar de que se ha informado de que los tomates procedentes de Europa y América del Norte comparten marcadores de isoenzimas y marcadores moleculares similares a los de México y Centroamérica, lo que sugiere que el tomate fue introducido en Europa y América del Norte a partir de estas regiones (Peralta et al., 2007, Bauchet and Causse, 2012). Ninguna de las hipótesis sobre el origen de la domesticación de tomate es concluyente e incluso podría ocurrir que la domesticación se produjera

I. Introducción

de forma independiente en ambas regiones de América, el Perú y México (revisado en (Bergougnoux, 2014).

Se determinó como el ancestro más probable del tomate cultivado, el tomate Cherry, usualmente identificado como *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme*, debido a su amplia representación en Centroamérica, sin embargo las investigaciones genéticas realizadas por (Nesbitt and Tanksley, 2002) demostraron que las plantas conocidas como *cerasiforme* son en realidad el producto de un cruce de tomate domesticado con especies silvestres relacionadas, y no constituye el antepasado directo del tomate cultivado. Un estudio muy reciente basado en el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP) no sólo confirma que *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* no es el ancestro del tomate cultivado, sino que también refuerza el modelo que apoya el origen de la pre-domesticación del tomate ocurrida inicialmente en la región andina (hipótesis Peruana), que se completó posteriormente (domesticación propiamente dicha) en Mesoamérica (hipótesis mexicana), y seguidamente tuvo lugar su introducción en Europa por los españoles para finalmente extenderse por todo el mundo (Blanca et al., 2012).

1.4. Importancia económica del cultivo de tomate

Actualmente, es un alimento que está en alza y así lo prueban los datos recogidos en los anuarios de producción de la FAO en los últimos 50 años que indican la producción mundial pasó de una media anual 34.703 miles de toneladas registrados entre 1969-1971 (Nuez, 1995) a unos 145.751 miles de toneladas registradas en el 2011 (FAO, 2012), es decir, la producción mundial aumento en los últimos 50 años un 425%, siendo actualmente la séptima especie cultivada más importante después del maíz, el arroz, el trigo, la patata, la soja y la yuca (Bergougnoux, 2014). Durante los últimos 20 años la producción de tomate así como el área dedicada a su cultivo se ha duplicado. Sorprendentemente, mientras que hace 20 años, Europa y las Américas han sido los productores más importantes, actualmente es Asia la que domina el mercado del tomate siendo China la primera productora mundial, seguido en orden decreciente por la India, EE.UU., Turquía,

Egipto, Irán, Italia, Brasil, situándose España en novena posición (FAO, 2012; **figura 1**) en el ranking mundial de producción de tomates siendo considerado como país exportador neto de este producto.

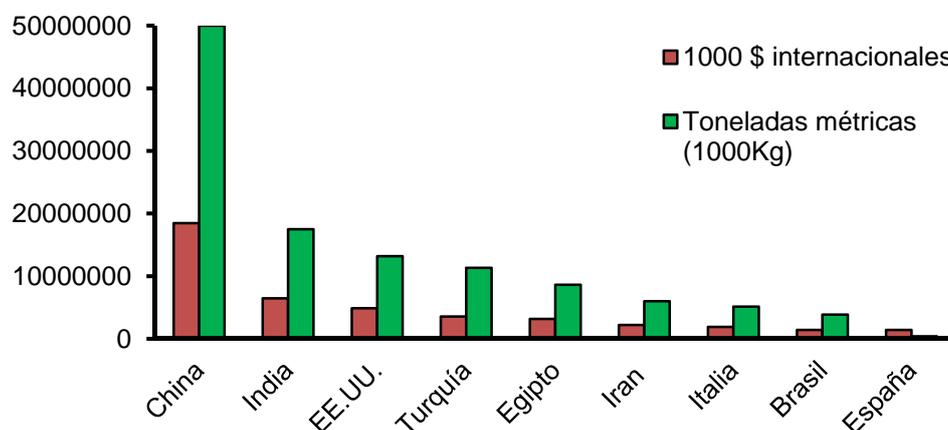


Figura 1. Ranking mundial de producción de tomates (FAO, 2012)

En el análisis general de la producción total agro-pecuaria (en toneladas de producto) para España (**figura 2**), el cultivo de tomate sitúa en 5ª posición (alcanzando casi las 4 millones Tn en 2011), tras el cultivo de aceitunas, producción de carne de cerdo, el cultivo de uva y la producción de leche, siendo además el 6º producto alimenticio que genera más ganancias económicas (FAO, 2012).

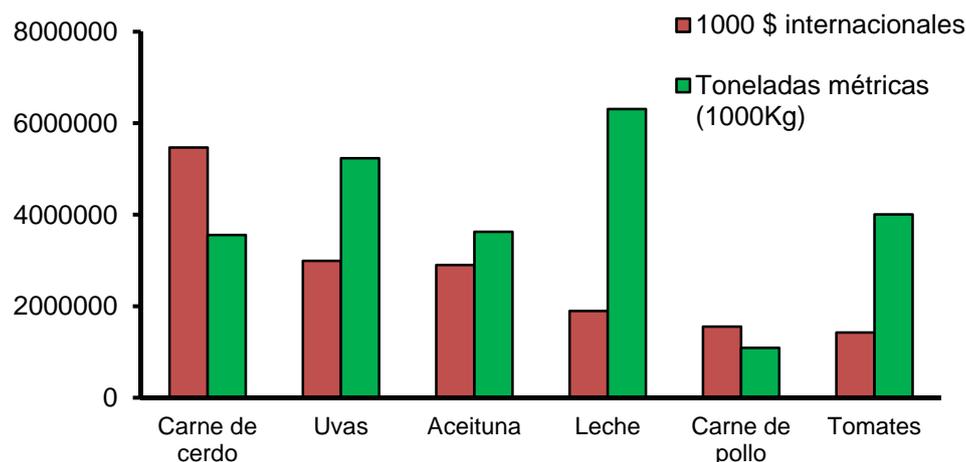


Figura 2. Producción agro-pecuaria en España (FAO, 2012)

Los actuales sobre el cultivo de tomate en España (**tabla 1**) indican que se dedica más del doble de extensión al cultivo al aire libre que al cultivo protegido de esta hortícola. El rendimiento para el cultivo al aire libre (Kg/He) disminuye un

I. Introducción

25% con respecto a los valores obtenidos para el cultivo protegido, lo que supone una pérdida potencial de rendimiento considerable para una industria de referencia en nuestro país.

Producción Tomate: Resumen nacional de superficie, rendimientos y producción, 2009 *							
Superficie (hectareas)				Rendimiento (Kg/He)			Producción (toneladas)
Secano	regadío		Total	Secano	regadío		
	Aire libre	Protegido			Aire libre	Protegido	
469	44.240	19.129	63.838	13.286	68.770	91.454	4.798.053

Tabla 1. Producción nacional de superficie, rendimiento y producción (MAGRAMA, 2010)

A pesar de que ambos tipos de cultivo están sujetos a controles que aseguran el estado óptimo de nutrientes (abonado) y un control estricto a nivel fitosanitario (disminuyendo el impacto del estrés biótico sobre la producción de ambos tipos de cultivo), se estima que es el estrés de tipo abiótico (frio, salinidad, sequía, etc.) el principal factor que incide o provoca esta sustancial disminución del rendimiento en el cultivo del tomate al aire libre.

2. Desarrollo vegetativo y reproductivo en Tomate

2.1. Etapas fenológicas del tomate

El tomate presenta diferentes etapas en su ciclo de crecimiento: establecimiento de las plantas jóvenes, crecimiento vegetativo, floración, cuaje y maduración del fruto. Cada etapa difiere en cuanto a sus necesidades nutricionales. A continuación se detallan las etapas fenológicas de tomate, considerando el cultivo de las plantas en campo abierto aunque se debe remarcar que el tiempo de duración de cada fase dependerá de la variedad, las condiciones ambientales y de manejo de los cultivos (**figura 3**).

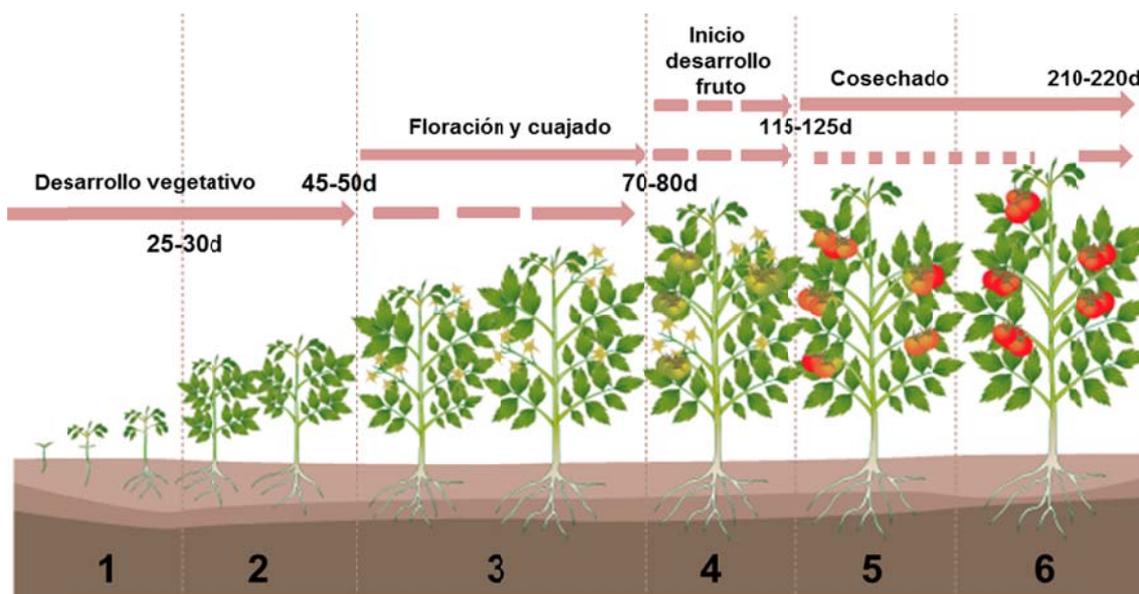


Figura 3. Etapas fenológicas del tomate. 1. Establecimiento de las plantas; 2. Crecimiento vegetativo; 3. Floración y cuajado; 4. Desarrollo del fruto; 5. Madurez fisiológica; 6. Cosechado (Imagen adaptada de <http://www.sqm.com>)

1. **Establecimiento de las plantas:** se centra en el desarrollo de raíces firmes e inicio de la formación de la parte aérea de la planta. Tras 25-30 días desde la germinación, se puede iniciar el trasplante desde semillero.

2. **El crecimiento vegetativo:** se lleva a cabo durante los primeros 45 a 50 días desde la germinación y en parte, se superpone a la etapa siguiente. En todo caso, después de 70-80 días se ralentiza hasta prácticamente anularse, sin dar lugar a más acumulación de materia seca en hojas y tallos.

3. **La floración y cuajado:** dependiendo de la variedad, de las condiciones ambientales y del manejo del cultivo, tanto la floración como el cuajado deben comenzar alrededor de 20 a 40 días desde el trasplante y continuar durante el resto del ciclo de cultivo.

4. **Desarrollo de los frutos:** después de que ocurra la floración y el cuajado, la fruta empieza a desarrollarse y crecer (70-80 días desde la germinación), alcanzando en este periodo una importante acumulación de materia seca en el fruto, a un ritmo relativamente constante.

5. **Madurez fisiológica y cosecha:** en promedio, madurez de los frutos se alcanza a los 80 desde el transplantado. La recolección continúa permanentemente, a menos que se interrumpa por razones climáticas (heladas) o por razones económicas (precio del tomate en el mercado).

2.2. Morfología de la planta y hábito de crecimiento

El tomate es una planta perenne que se cultiva como planta anual; puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta y el hábito de crecimiento es limitado (variedades determinadas) e ilimitado (variedades indeterminadas) y este rasgo, el hábito de crecimiento, está controlado por el locus *Self Pruning* (*sp*) (Pnueli et al., 1998). El hábito determinado (tipo arbusto) lleva el alelo mutante recesivo *sp*. Se produce un número limitado de racimos, dependiendo de la planta, y las condiciones climáticas. El número de hojas o entrenudos entre inflorescencias varía de uno a tres. En el racimo terminal la parte aérea termina con una inflorescencia y no se producen brotes laterales. Las plantas con hábito determinado son muy adecuadas para la experimentación con espacio limitado sin prescindir del análisis de la producción (Martí et al., 2006, Carvalho et al., 2011b, Okabe et al., 2011).

Las variedades con hábito de crecimiento indeterminado (tipo estándar o alto) portan el alelo dominante (*sp*⁺). Se observan tres hojas o entrenudos generalmente entre inflorescencias. Cada segmento simpodial produce tres yemas: la yema terminal se transforma en una yema de floración; una de las dos yemas axilares se transforma en un brote lateral que produce las siguientes tres yemas y continúa la prolongación del tallo. Las plantas de este tipo crecen con la repetición continua de este patrón de crecimiento, conocida como el crecimiento simpodial (Heuvelink, 1995).

Concretamente la variedad utilizada en este trabajo, *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker presenta un hábito de crecimiento indeterminado, guiado por el crecimiento de un tallo principal. Su sistema radicular está compuesto por una raíz

principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. En el tallo principal se desarrollan hojas, tallos secundarios e inflorescencias. Las hojas son compuestas, con folíolos peciolados, lobulados y con borde dentado.

2.3. Morfología de la flor

La flor es regular e hipógina y consta del mismo número de sépalos que de pétalos (de color amarillo). Los estambres, que se desarrollan fusionados formando un cono estaminal, envuelven al gineceo, con un ovario bi o plurilocular. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso, denominadas dicasio y se unen al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión, distinguible por un engrosamiento con un pequeño surco originado por una reducción del espesor del córtex. (Ver **figura 4**)

2.4. Polinización y fecundación en tomate

En botánica, se denomina autogamia al modo de reproducción sexual consistente en la fusión de gametos femeninos y masculinos producidos por el mismo individuo. La autogamia puede ser obligada o facultativa. Las semillas producidas por una planta autógena obligada provienen solamente de la autopolinización y autofecundación. La alogamia es un tipo de reproducción sexual en plantas consistente en la polinización cruzada y fecundación entre individuos genéticamente diferentes.

Mientras el tomate domesticado es autocompatible (AC), es decir, tiene capacidad de autopolinizarse y autofecundarse, las especies silvestres de tomate se diferencian entre sí por su modo de reproducción. Así, hay especies autoincompatibles (AI) y, por lo tanto, son «alógamas». Por otro lado, hay especies que usualmente se autopolinizan y autofecundan, se dice que son autocompatibles (AC) y, por tanto, autógenas. Entre ambos extremos, finalmente, hay especies que presentan poblaciones AI y AC, y otras que son usualmente AI pero pueden dar

I. Introducción

una proporción de semillas por autofecundación (se las llama alógamas facultativas).

El grado en que los estigmas se elongan por encima de los estambres (variable que se denomina «protrusión de los estigmas») es un determinante central en la posibilidad de polinización cruzada y así, de la alogamia en estas especies. Las especies relacionadas con el tomate que son AI obligadas o facultativas presentan flores con los estigmas muy protruidos. En contraste, otras especies tales como el tomate cultivado, presentan los estigmas insertos lo que promueve la autopolinización. Se ha observado que una región del genoma del tomate (un QTL, acrónimo inglés para designar un locus que determina o gobierna un carácter cuantitativo) denominada *se2.1* es responsable de una gran proporción de la variabilidad fenotípica observada para este carácter y que las mutaciones en este locus están involucradas en la evolución desde la alogamia hacia la autogamia en estas especies. La localización de este QTL en el genoma del tomate ha permitido concluir que *se2.1* es un locus complejo que comprende por lo menos 5 genes estrechamente ligados, uno que controla la longitud del estilo, tres que controlan el tamaño de los estambres y el último que gobierna la dehiscencia de las anteras. Este grupo de genes representaría los vestigios de un complejo ancestral de genes co-adaptados que controlan el tipo de apareamiento en estas especies de *Solanum* (Chen and Tanksley, 2004).

En 2007 se ha avanzado un paso más en la comprensión de este grupo de genes ya que se ha determinado la secuencia de bases del locus *Style2.1*, el gen responsable de la longitud del estilo. Este gen codifica un factor de transcripción que regula el alargamiento celular de los estilos en desarrollo. La transición desde la AI a la AC estuvo acompañada, más que por un cambio en la proteína STYLE2.1, por una mutación en el promotor del gen *style2.1* que dio como resultado la disminución en la expresión de ese gen durante el desarrollo floral y, por ende, el acortamiento consecuente de la longitud de los estilos (Chen et al., 2007)

2.5. Cuajado y desarrollo del fruto

En el desarrollo normal de un fruto, el inicio del cuajado depende del éxito de la polinización y fecundación (Gillaspy et al., 1993). La polinización ocurre tras la formación del grano de polen en la antera y su liberación. La fertilización se produce en el gameto femenino localizado en los carpelos de la flor. Requiere de la germinación del polen, el crecimiento del tubo polínico a través del tejido estilar, la penetración en el saco embrionario y la fusión con la célula huevo (Dumas and Mogensen, 1993, Mascarenhas, 1993). La fertilización del óvulo generalmente desencadena el desarrollo del ovario del fruto. No obstante, en los mutantes partenocárpicos el desarrollo de un fruto puede ocurrir en ausencia de polinización y fertilización (Gorguet et al., 2005). Si, tal y como se asume de forma universal, la función principal de un fruto es la dispersión de la semilla, los frutos partenocárpicos son una paradoja biológica. Los primeros estudios fisiológicos sugerían que la partenocarpia en tomate estaba relacionada con un desequilibrio en el control hormonal (ver (Gorguet et al., 2005)). El bajo nivel de citoquininas y giberelinas detectado en el mutante estéril de tomate *stamenless-2* parece indicar que esas hormonas pueden alterar la fertilidad (Sawhney and Shukla, 1994). Siguiendo con esta línea argumental, cuando se altera de forma específica la ruta de señalización de citoquininas o giberelinas en las anteras o el polen de plantas transgénicas de maíz, tabaco y *Arabidopsis* se produce el aborto de estos órganos (Huang et al., 2003). Estos resultados parecen confirmar las implicaciones funcionales de las citoquininas y las giberelinas en el desarrollo reproductivo de las plantas. Adicionalmente, se ha reportado que el ácido jasmónico y el etileno están implicados en la maduración del polen, dehiscencia de la antera y antesis de la flor (Gorguet et al., 2005).

Por otro lado, las giberelinas desempeñan un papel clave durante el cuajado y desarrollo del fruto de tomate. Según (García-Martínez et al., 1991), las giberelinas producidas por las semillas en desarrollo promueven el desarrollo normal del fruto. De acuerdo con esto, la aplicación de giberelinas exógenas podría reemplazar el efecto de las giberelinas producidas por las semillas, dando lugar al cuajado y desarrollo de frutos partenocárpicos. Las auxinas también están implicadas en el

I. Introducción

desarrollo de frutos partenocárpicos. De entre todas las hormonas, las auxinas han sido las más empleadas para promover partenocarpia a través de la ingeniería genética (Schwabe, 1981, Ficcadenti et al., 1999, Pandolfini et al., 2002, Carmi et al., 2003, Rotino et al., 2005). De hecho, la actividad enzimática relacionada con la biosíntesis de giberelinas está regulada por auxinas, siendo éstas además necesarias para mantener un nivel adecuado de giberelinas activas (Ross et al., 2000). Recientemente, se ha avanzado considerablemente en el conocimiento del papel que juegan los diferentes componentes relacionados con el cuajado del fruto (Pandolfini et al., 2007, de Jong et al., 2009a), aunque aún no se conocen con exactitud los determinantes que promueven este proceso.

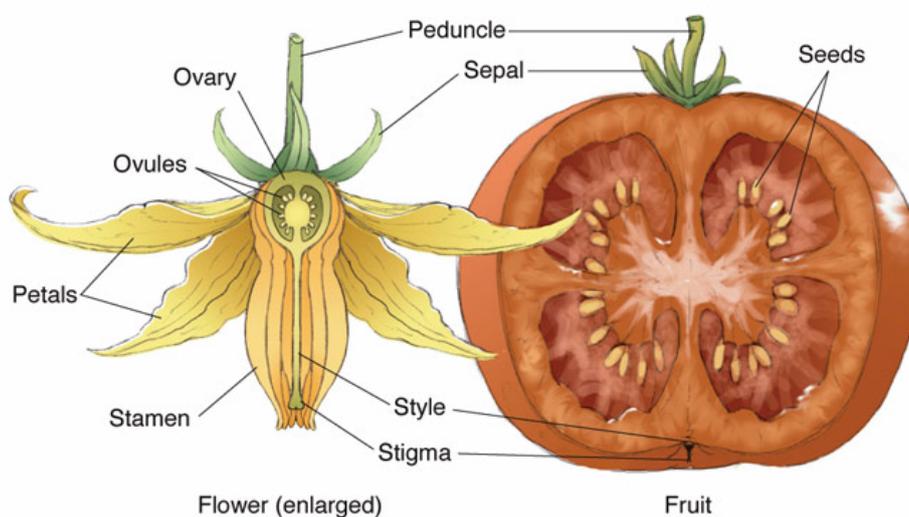


Figura 4. Comparación e identificación de las diferentes estructuras en la flor y el fruto del tomate. Peduncule, Pedúnculo; Sepal, Sépalos; Petals, Pétalos; Ovary, Ovario; Ovules, Ovulos; Style, Estilo; Stigma, Estigma; Stamen, Cono estaminal; Seeds, Semillas. El gineceo los forman el ovario, estilo y estigma y también se conoce como Pistilo. El Androceo corresponde al cono estaminal formado por las Anteras y filamentos. Adaptado de (Bergougnoux, 2014)

El desarrollo del fruto de tomate puede dividirse en 4 fases. La primera fase empieza cuando la flor ha sido polinizada y fecundada; está relacionada con el desarrollo del ovario y la decisión de abortar o continuar con el desarrollo del fruto (cuajado) (**figura 5A**). En la segunda fase el crecimiento del fruto ocurre principalmente como consecuencia de intensas divisiones celulares (**figura 5B**). En

la tercera fase, cesa la división celular y el fruto continúa el crecimiento a través de la expansión celular hasta que alcanza el tamaño final (**figura 5C**). La cuarta y última fase es la maduración (**figura 4D**), caracterizada por una serie de cambios químicos y estructurales que determinan el aroma, color, textura y composición final del fruto (Gillaspy et al., 1993). Cada una de estas características organolépticas es producto de modificaciones celulares y bioquímicas diferentes (Giovannoni, 2004).

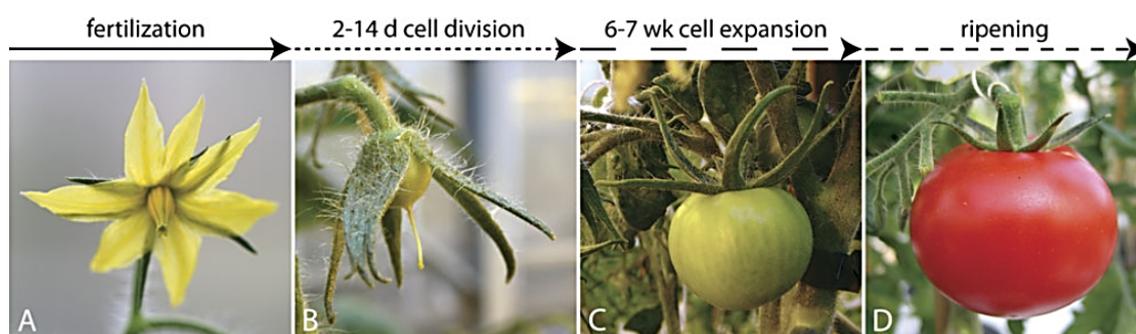


Figura 5. Desarrollo del fruto de tomate. (A) La primera etapa del desarrollo comienza cuando la flor ha sido polinizada y fecundada. (B) Etapa de división celular, se extiende desde los 2-14 días después de la fecundación. (C) La expansión celular dura entre 6-7 semanas. (D) Maduración del fruto. Adaptado de (de Jong et al., 2009a).

2.6. Morfología del fruto

El fruto de tomate es una baya de forma globular, ovoide o aplastada, bi o plurilocular. El tamaño y la forma del mismo varían en función de la variedad y de las condiciones de desarrollo. En el caso del cultivar Moneymaker, el fruto es globular y sin hombros. El fruto adulto de tomate está constituido, básicamente por el pericarpo, el mucilago, placenta y semillas (**figura 6**). El pericarpo lo componen la pared externa, las paredes radiales o septos que separan los lóculos y la pared interna o columnela. El pericarpo se origina de la pared del ovario y consta de un exocarpo, un mesocarpo parenquimático con haces vasculares y el endocarpo constituido por una capa unicelular que rodea los lóculos. El exocarpo está compuesto por una epidermis que no posee estomas, y varias capas subepidérmicas de tipo colenquimático. La epidermis está cubierta por una fina cutícula que engrosará a medida que se desarrolla el fruto (Wilson and Sterling,

1976). El mesocarpo está compuesto principalmente por células parenquimáticas y los haces vasculares. El endocarpo se compone de una capa celular que delimita las cavidades loculares. Las cavidades loculares son huecos en el pericarpo y contienen las semillas, cubiertas por el tejido placentario. El mucilago colinda con la placenta (dado que surge a partir de ésta) y comienza a expandirse durante el desarrollo dentro de los lóculos hasta rodear completamente las semillas.

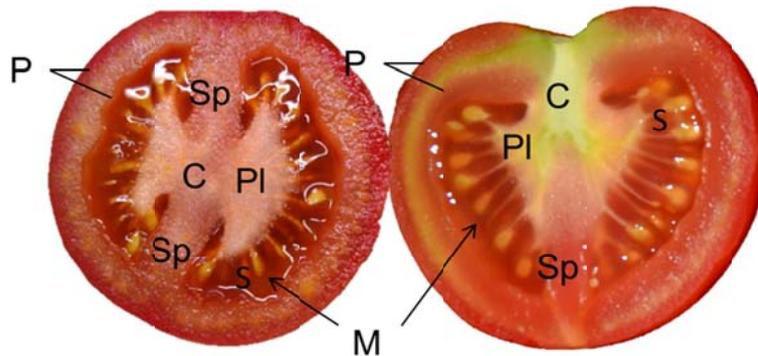


Figura 6. Corte transversal y longitudinal de un fruto de tomate bilocular. Se observan el pericarpo (P), los septos (Sp), las semillas(S), en contacto con la placenta (Pl) rodeadas de Mucilago (M), y en el eje central se encuentra la columna (C).

Las semillas se componen del embrión, el endospermo y la testa o cubierta seminal que suele ser un tejido duro con pelos. Ésta es la capa más externa de la semilla derivada a partir del tegumento que rodea inicialmente al óvulo (Chamarro, 1995). El tegumento es un tejido de varias capas: una interna, una externa y una zona de tejido en el medio de estas dos. Su función principal es proteger al embrión y las sustancias de reserva (Esau, 1985).

2.7. Composición del fruto

El tomate es un fruto con pocas calorías, apenas aporta 18 por cada 100 gramos. Aproximadamente el 95% de su peso fresco es agua y la disponibilidad de agua por la planta puede influir en el tamaño del fruto. El segundo componente mayoritario en el tomate son los hidratos de carbono, que representan aproximadamente un 4% de su peso fresco. La glucosa y la fructosa son los

principales azúcares presentes en el fruto y representan el 50% de la materia seca. Los ácidos orgánicos, principalmente, cítrico y málico, representan más del 10% de la materia seca (Mahakun et al., 1979) y le otorgan el sabor ácido característico. Azúcares y ácidos orgánicos representan la casi totalidad de la materia seca del fruto de tomate (Ver **tabla 2**).

Aproximado			Minerales			Vitaminas		
Agua	94.52	g	Calcio	10	mg	Vitamina C	13,7	mg
Energía	18	Kcal	Magnesio	11	mg	Colina	6.7	mg
Proteína	0.88	g	Fósforo	24	mg	Vitamina A	42	µg
Lípidos	0.2	g	Potasio	237	mg	α-Caroteno	449	µg
Fibra	1.2	g	Sodio	5	mg	β-Caroteno	101	µg
Azúcares	2.63	g	Fluor	2,3	µg	Licopeno	257	µg
						Luteína-	123	µg
						Zeaxantina		
						Vitamina K	7,9	µg

Tabla 2. Composición del fruto de tomate maduro.

Valor nutricional de 100 g de tomate maduro fresco (Bergougnoux, 2014). Se cuantifican los principales compuestos que contiene el tomate.

2.8. Calidad organoléptica y nutricional del tomate: su importancia como alimento funcional

Respecto a su calidad nutricional y su interés como alimento funcional, su bajo aporte calórico junto con su alto contenido en minerales, vitaminas y antioxidantes, lo convierten en un alimento muy apreciado de acuerdo con las pautas de alimentación actuales. Es una fuente excelente de potasio, folatos y vitaminas. Mientras que su contenido en los dos primeros es similar al de otras frutas y hortalizas de consumo habitual, el tomate ofrece mucho mayor contenido en la vitamina E o α-tocoferol y en la vitamina C o ácido ascórbico (Canene-Adams et al., 2005).

I. Introducción

Entre los compuestos más representativos del tomate destacan la vitamina C, los carotenoides destacando entre éstos el β -caroteno y el licopeno, y los compuestos fenólicos, con probadas propiedades beneficiosas para la salud debido a su actividad antioxidante que protege frente a los radicales libres, causantes de múltiples procesos degenerativos. En planta superiores, la vitamina C está directamente involucrada en múltiples procesos fisiológicos fundamentales, entre otros muchos, la eliminación de especies activas de oxígeno, el control del crecimiento y del metabolismo de las células, la división celular, la expansión de la pared celular y la síntesis de otros metabolitos (Smirnoff et al., 2001). Como antioxidante, el ácido ascórbico elimina radicales libres de oxígeno causantes del daño oxidativo y en humanos su consumo se ha relacionado con la reducción del daño oxidativo y la mejora en procesos inflamatorios (Aguirre and May, 2008).

En la dieta, el β -caroteno actúa esencialmente como precursor de la vitamina A y constituye aproximadamente el 7% del contenido en carotenoides en tomate (Nguyen, 1999). Tanto β -caroteno como licopeno poseen propiedades antioxidantes eliminando radicales y especies activas de oxígeno y evitan la auto-oxidación de los lípidos por la acción de radicales libres. En general se piensa que, para la prevención de enfermedades degenerativas, es necesaria la acción sinérgica de β -caroteno y licopeno junto a otros antioxidantes. La capacidad de licopeno para neutralizar el efecto negativo del radical oxígeno singlete es casi dos veces la de β -caroteno (Thompson et al., 2000) y es responsable del color rojo del fruto, constituyendo cerca del 80-90% del contenido total en carotenoides (Shi and Maguer, 2000). A diferencia de β -caroteno, solo algunos vegetales contienen licopeno. El tomate representa la fuente más importante de licopeno de la dieta y su contenido en éste es considerado como criterio de calidad esencial. Muchos estudios concluyen que el licopeno posee un reconocido efecto beneficioso para la salud por su capacidad para prevenir diversos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Bramley, 2000, Shi and Maguer, 2000). Por último, los compuestos fenólicos también juegan un papel importante en la salud humana y en la prevención de enfermedades (Fernandez-Panchon et al., 2008). El tomate es rico en compuestos fenólicos, especialmente en flavonoles que se concentran en la piel, de

los cuales las formas conjugadas de quercetina y kaempferol representan un 98% (Stewart et al., 2000).

3. Desarrollo del fruto en ausencia de fecundación: Partenocarpia

El término partenocarpia se refiere a la producción de frutos sin semillas. Para que se produzcan frutos sin semillas, la aptitud partenocárpica tiene que ir asociada a la ausencia de fecundación. En función del mecanismo que evita la fecundación se distinguen dos tipos de partenocarpia (Carmi et al., 2003):

La partenocarpia obligada es la propia de aquellas especies que presentan esterilidad femenina, por lo tanto, los frutos de estas variedades no contienen semillas independientemente de que se evite o no la polinización. Habitualmente, la esterilidad femenina va acompañada de esterilidad masculina por lo que además, de no formar semillas ni por autopolinización ni por polinización cruzada, tampoco pueden polinizar a otras variedades.

La partenocarpia facultativa es la propia de aquellas especies que son autoincompatibles o tienen esterilidad masculina. Esto implica que, la ausencia de semillas depende de que se evite la polinización cruzada con otras variedades que aporten polen fértil y compatible con éstas.

Además, se distingue también entre partenocarpia vegetativa o autónoma, cuando no es necesario el estímulo de la polinización para el desarrollo del fruto y partenocarpia estimulada, cuando se requiere de la polinización para estimular el desarrollo del ovario pero éste no es fecundado, por lo que el fruto final no contiene semillas. El estudio de este fenómeno es muy interesante desde el punto de vista de investigación fundamental en biología vegetal para profundizar en los mecanismos moleculares que median en el cuajado del fruto, al separar este proceso del desarrollo del embrión (Spena and Rotino, 2001).

La ausencia de semillas mejora la calidad de los frutos en varios aspectos. Representa, una ventaja para el consumidor cuando las semillas son duras o tienen mal sabor, como ocurre con las uvas. Además en ausencia de semillas retrasa la

senescencia del fruto puesto que ésta se induce por las semillas (Varoquaux et al., 2000). Las plantas partenocárpicas pueden mantener la producción de frutos incluso durante los meses invernales cuando las bajas temperaturas disminuyen o incluso anulan la viabilidad y capacidad del polen para la fecundación (Karapanos et al., 2008). En el caso de la partenocarpia obligada, ésta presenta además ventajas de tipo comercial. Si todos los frutos carecen de semillas, se debe comprar la semilla todos los años a la casa comercial. A pesar de estas ventajas, la partenocarpia no se ha usado ampliamente en la producción agrícola. En algunos casos, las mutaciones que permiten el desarrollo de fruto partenocárpico tienen efectos pleiotrópicos que dan como resultado malformaciones en los frutos y afectan negativamente a la calidad. En otras ocasiones, este carácter está controlado por QTLs y depende de la acción de sistemas multigénicos, lo que dificulta su introducción en otras variedades.

El tomate es la especie modelo aceptada completamente por la comunidad científica para el estudio del desarrollo y maduración de fruto carnoso (Giovannoni, 2004). En esta especie existen diversos cultivares capaces de desarrollar frutos partenocárpicos y además, se ha logrado inducir la producción de frutos partenocárpicos, mediante ingeniería genética y mediante aplicación de fitorreguladores (Gorguet et al., 2005). Debido a todo ello esta especie hortícola es un sistema ideal para el estudio de la partenocarpia.

3.1. La Partenocarpia natural o espontánea

El carácter partenocarpia se encuentra de manera natural en algunas variedades de diversas especies de interés agronómico, entre ellos el tomate. La partenocarpia es un proceso biológico complejo, tanto en términos fisiológicos como genéticos. Para desentrañar la regulación molecular de la partenocarpia es necesario dilucidar el mecanismo de iniciación de cuaje y desarrollo del fruto así como su relación con las vías de transducción de señales de la planta. Sin embargo, la comprensión de los mecanismos subyacentes a la inducción de la partenocarpia actualmente sigue siendo limitada.

Se conocen cinco fuentes principales de generación de fruto partenocárpico en tomate que han sido estudiadas por medio de asociaciones de QTLs: *pat-1*, *pat-2* y *pat3/pat4* (Soressi GP, 1975, Philouze, 1983, Beraldi et al., 2004) y dos líneas de introgresión con *Solanum habrochaites* acc. LYC4: *ITV-line1* (*pat-4.2-pat-9.1*) y *LN5.1* (*pat4.1-pat-5.1*) (Gorguet et al., 2008).

Estas líneas son capaces de producir frutos partenocárpicos tras la emasculación y estos frutos presentan casi las mismas propiedades que los frutos obtenidos después de polinización y fertilización. El mutante *pat-1* (también conocido como *Soressi* o *Montfaver 191*) ha sido ampliamente analizado, aunque presenta efectos pleiotrópicos que afectan, no sólo al cuajado de los frutos, sino también a la morfología de la flor, con estambres anormales y desarrollo temprano del óvulo (Mazzucato et al., 1998). En *pat-2* (también conocido como línea *Severanin*) un solo gen recesivo sin efectos pleiotrópicos es responsable de la partenocarpia (Philouze and Milesi, 1985). El Sistema *pat-3/pat-4* (también conocido como línea RP75/59) que presenta partenocarpia facultativa fue descrito en una progenie de un cruce entre las variedades *Atom* × *Bubjekosko* (Fos et al., 2001).

De estas líneas partenocárpicas, a pesar de haber sido ampliamente estudiadas, aún no se ha conseguido aislar ninguno de los genes responsables del fenotipo. En las líneas *pat-2* y *pat-3/pat-4* existe controversia en cuanto al número de genes implicados en el control del carácter. En la línea *pat-3/pat-4*, finalmente se ha aceptado un modelo genético con dos genes, *pat-3* y *pat-4* (Nuez F. , 1986, Philouze and Milesi, 1989). El contenido de GAs en los ovarios de estos tres mutantes está alterado incluso antes de la polinización y parece jugar un papel clave en la aparición del fenotipo partenocárpico (Fos et al., 2000, Fos et al., 2001, Olimpieri et al., 2007). Por desgracia poco más se sabe acerca de estos sistemas genéticos; ninguno de los genes han sido clonados y sólo el gen *pat-1* se ha mapeado en el brazo largo del cromosoma 3 (Beraldi et al., 2004).

Con respecto a las líneas de introgresión IL5-1 e IVT-line1, se conoce que la partenocarpia en la línea IL5-1 está bajo el control de dos QTL, uno en el

I. Introducción

cromosoma 4 (*pat4.1*) y otro en el cromosoma 5 (*pat5.1*) mientras que la línea IVT-line1, también contiene dos QTL para partenocarpia, uno en el cromosoma 4 (*pat4.2*) y otro en el cromosoma 9 (*pat9.1*). Además, se identificó un locus para la protusión del estigma en IL5-1, localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (*se5.1*). Es probable que *pat4.1*, encontrado en IL5-1, y *pat4.2*, encontrado en IVT-line1, y ambos ubicados cerca del centrómero del cromosoma 4, sean alelos del mismo gen (Gorguet et al., 2008).

Igualmente en otra solanácea, la berenjena, los mutantes para QTLs relacionados con la partenocarpia, *Cop3.1* y *Cop8.1* fueron delimitados a los cromosomas 3 y 8 (Miyatake et al., 2012). Los análisis de QTLs para cítricos (*Citrus volkameriana* x *Poncirus trifoliata*) revelaron que los mutantes para QTLs identificados para el parental masculino *Fn2* o *Fn3* podrían estar involucrados en la partenocarpia (García et al., 2000).

Los estudios anteriores sugirieron que la partenocarpia es un rasgo cuantitativo que puede estar controlado por múltiples genes pero sin embargo, recientes investigaciones a nivel molecular indicaron que la partenocarpia podría estar controlada por un solo gen, tipo receptor o factor de transcripción de la vías de señalización para fitohormonas como por ejemplo, el caso descrito para *SITR1* (Receptor de auxinas) de tomate (Ren et al., 2011). Siguiendo esta línea, se identificó el gen *ARF8* (*Auxin Response Factor 8*) como un potencial gen candidato para los QTLs *pat-4.1* y *pat-4.2*, y del cual se sabe que actúa como un inhibidor que promueve el desarrollo del carpelo en *Arabidopsis*, en ausencia de polinización/fertilización. La expresión heteróloga de una forma aberrante del gen de *Arabidopsis* *ARF8* en el tomate causa la partenocarpia en éste (Gorguet et al., 2008).

3.2. Partenocarpia mediante aplicación de fitorreguladores

El cuajado del fruto está controlado por un delicado balance hormonal en el ovario. Durante la antesis el nivel de hormonas en el ovario es mínimo y únicamente tras la polinización y fecundación se produce un aumento de señales reguladoras que

inducen el cuajado del fruto. Mediante la aplicación exógena de hormonas es posible superar el umbral de concentración hormonal necesario para la inducción del cuajado del fruto. La aplicación de citoquininas y poliaminas induce el cuajado partenocárpico (Mapelli, 1981, Fos et al., 2003), sin embargo han sido las auxinas y giberelinas las hormonas más empleadas.

En agricultura se ha empleado la aplicación de auxinas sintéticas (4 clorofenoxiacético, ácido 2-hidroximetil-4-clorofenoxiacético, 3-indolbutírico, ácido naftalencético y ácido 2-4-diclorofenoxiacético) para conseguir producción del fruto a lo largo de todo el año (Chamarro, 1995). Estas sustancias, pulverizadas sobre las flores, inducen el cuajado y permiten la obtención de frutos en condiciones ambientales desfavorables para la polinización y fecundación. Sin embargo, el empleo de estas prácticas en la agricultura, a pesar de conseguir mejorar el cuajado en condiciones adversas, no está muy extendido probablemente porque la utilización de fitoreguladores supone un gasto adicional y los frutos obtenidos en muchos casos presentan tamaño menor y malformaciones, como escaso desarrollo de los lóculos y alteraciones en la pulpa (Serrani et al., 2007), lo que afecta negativamente a su calidad e imposibilitan su comercialización.

3.3. Partenocarpia mediante transgénesis

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

Una de las estrategias más empleadas es la partenocarpia inducida mediante la construcción *DefH9::iaaM* (Rotino et al., 1997). Esta construcción contiene un gen quimérico con el promotor del gen *Deficiens Homologue 9 (DefH9)* de *Antirrhinum*

I. Introducción

majus (L.) y la secuencia del gen *iaaM* de *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi* (Van Hall). El gen *iaaM* codifica para una triptófano monooxigenasa que convierte el triptófano en indolacetamida que es hidrolizada por las plantas para dar lugar al ácido indolacético (IAA), la auxina más común que producen las plantas. Esta construcción se expresa específicamente en los óvulos produciendo un aumento de la concentración de auxinas en los óvulos, lo que induce el desarrollo de frutos partenocárpicos en ausencia de fecundación, pero no impide el desarrollo de frutos con semillas cuando tiene lugar la polinización. Esta estrategia ha sido efectiva para la obtención de plantas partenocárpicas en tomate (Ficcadenti et al., 1999) y en otras especies, como tabaco y berenjena (Rotino et al., 1997), fresa y frambuesa (Mezzetti et al., 2004), pepino (Yin et al., 2006) y vid (Costantini et al., 2007).

En tomate, la construcción *DefH9::iaaM* se ha empleado con éxito para inducir el desarrollo partenocárpico del fruto. Sin embargo, cuando se introduce esta construcción en determinadas variedades de esta especie hortícola, los frutos desarrollados presentan malformaciones similares a las causadas por la aplicación de auxinas para inducir el cuajado (Pandolfini et al., 2002).

Aparte de las estrategias basadas en la alteración directa del metabolismo de las hormonas, la alteración de los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta a éstas también produce desarrollo partenocárpico del fruto. En tomate se han desarrollado plantas transgénicas que expresan heterológicamente el gen *roIB* en el ovario para inducir desarrollo partenocárpico (Carmi et al., 2003). El gen *roIB* procede de *Agrobacterium rhizogenes* (Conn) y si se expresa constitutivamente en la planta e induce síntomas característicos del tratamiento con auxinas. Sin embargo, cuando está bajo el control de secuencias específicamente reguladoras de *TPRPF1* (*Tomato Prolin Rich Protein*), que se expresa durante las fases tempranas del desarrollo del fruto, las plantas transgénicas son capaces de desarrollar frutos sin semillas.

Más recientemente se ha conseguido la obtención de plantas transgénicas que producen frutos partenocárpicos por medio de la ablación genética usando la construcción *PsEND1::Barnasa* (Medina et al., 2013). El gen de la ribonucleasa

(Barnasa) de *Bacillus amyloliquefaciens* (Hartley, 1988), induce la ablación genética selectiva de las líneas celulares que participan en la arquitectura de la antera en las primeras etapas de desarrollo. La expresión del gen *Barnasa* fue dirigida a las anteras usando un promotor específico de antera de guisante *PsEND1* (*Pisum sativum endotecio 1*) que muestra expresión temprana en las células primordiales de anteras y de la epidermis, y durante el desarrollo en las células conectivas y parietales de anteras (Gómez et al., 2004). La expresión de este gen provoca anomalías en la formación de las anteras impidiendo su formación y funcionalidad. Los ovarios de estas plantas dieron lugar a cuaje de fruto sin mediar fertilización y finalmente a frutos partenocárpicos.

3.4. Regulación hormonal y génica en la partenocarpia

Auxinas y GAs parecen ser las hormonas predominantes en la regulación del proceso de cuaje de fruto, ya que las aplicaciones exógenas de ambos tipos de hormonas conducen a la iniciación de este proceso para dar lugar a frutos partenocárpicos (de Jong et al., 2009a). También otras hormonas como la citoquinina, etileno, y ABA contribuyen pero sus funciones no han sido estudiada en profundidad hasta la fecha (Kumar et al., 2014)(**figura 7**). En general, la auxina estimula la división celular en el desarrollo de los frutos de tomate, mientras que giberelina estimula la elongación celular (Bunger-Kibler S, 1983).

3.5. Genes implicados en la regulación de Auxinas cuya alteración induce la formación de frutos partenocárpicos

Las auxinas se definen como fitohormonas que promueven la división celular (Serrani et al., 2007). El ácido indolacético (IAA) es una auxina natural mayoritariamente presente en plantas y se encuentran como ácidos libres o formas conjugadas. Las auxinas están relacionadas con etapas de crecimiento intenso, se detecta su presencia en el meristemo apical de donde se distribuye por los diferentes órganos en crecimiento de la planta creando un gradiente de

concentración (Mounet et al., 2012). Hasta la fecha se han estudiado numerosos mutantes que han aportado una información muy valiosa para conocer que genes están implicados, tanto de la síntesis, como de su regulación de auxinas y su implicación en la partenocarpia en tomate. La información generada por estos estudios disponibles hasta la fecha se resume a continuación (**figura 7**).

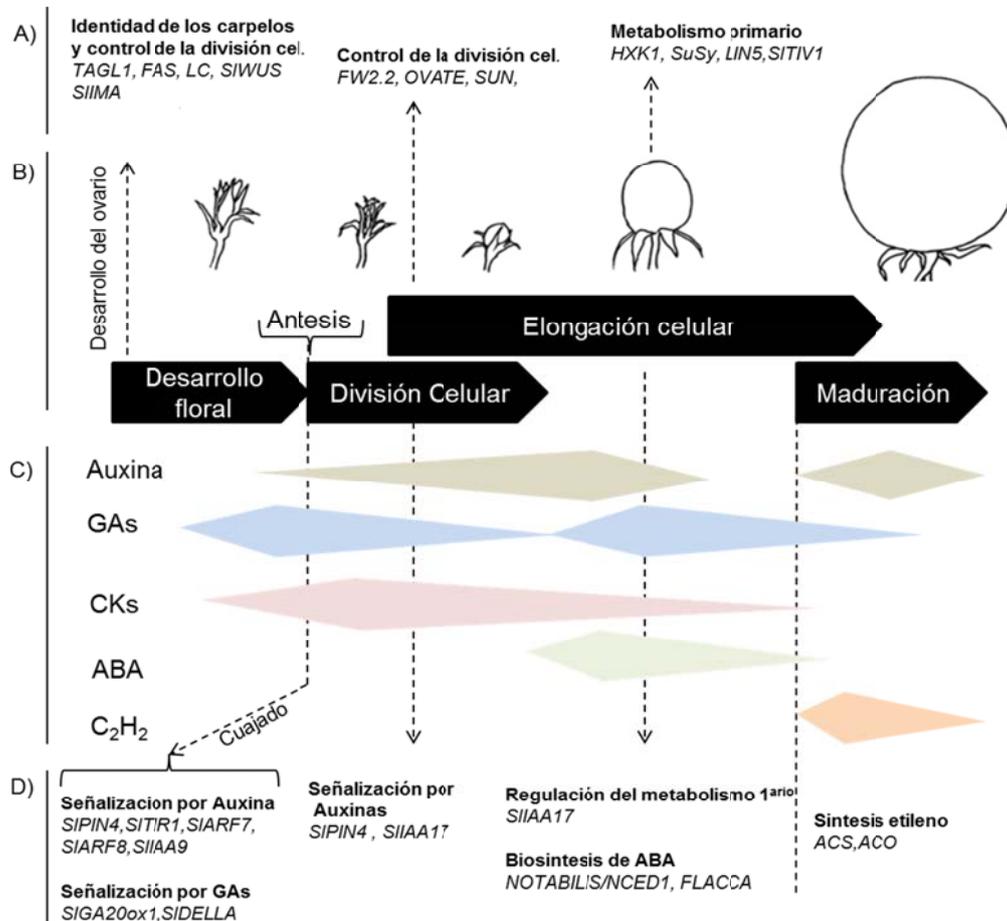


Figura 7. Aspectos generales de la regulación hormonal y génica en el desarrollo de la flor y el fruto en tomate. A) genes implicados en desarrollo y metabolismo del fruto de tomate. B) Esquema de las fases de la fructificación en tomate. C) representación esquemática de la implicación de las diferentes hormonas en la fructificación de tomate. GAs, giberelinas; CKs, citoquininas; ABA; Ácido Abscísico; C₂H₂, Etileno. D) Genes relacionados con la regulación hormonal. Imagen adaptada de (Srivastava and Handa, 2005, Klee and Giovannoni, 2011, Bergougnoux, 2014, Azzi et al., 2015)

El primer gen descrito implicado en la regulación de Auxinas en tomate fue *SIIAA9*, un regulador transcripcional que media múltiples aspectos de la respuesta de las plantas a auxina a partir de genes Aux/IAA (auxina/indol-3-acético), capaz de

inducir un fenotipo partenocarpia (Wang et al., 2005). Todas las líneas transgénicas antisentido para *SIIAA9* exhibieron un desarrollo precoz del fruto iniciado antes del estadio de antesis, dando lugar frutos partenocárpico (Wang et al., 2009). Un estudio reciente muestra que las plantas de tomate silenciados para el represor transcripcional Aux/IAA (*SIIAA17*) presenta frutos más grandes con tejido pericárpico más grueso (Su et al., 2014). En este fenotipo se derivó de una mayor expansión de las células debido a los altos niveles de ploidía. Esto sugiere una mejora del proceso de endo-reduplicación en ausencia de la cantidad óptima de *SIIAA17* durante el desarrollo del fruto.

Los factores de respuestas a auxina están implicados en la regulación de los niveles de auxina y la partenocarpia como es el caso del factor de respuesta a auxina *ARF8* (*Auxin Response Factor 8*). La mutación en *AtARF8* de Arabidopsis desacopla el inicio de la fructificación, resultando en la formación de frutos partenocárpico (Goetz et al. 2006). Otro factor de respuesta a auxina, concretamente *SIARF7*, controla específicamente los procesos de desarrollo de forma dependiente de auxina. Los niveles de expresión para *SIARF7* se van incrementando a lo largo del desarrollo floral, permaneciendo altos en ovarios maduros no polinizados y disminuyendo tras 48 h de la polinización. Los frutos transgénicos (de línea RNAi *SIARF7*) tenían forma de corazón y el pericarpio fue bastante grueso en comparación con el pericarpio de frutos de tipo salvaje. El análisis microscópico mostró que esta diferencia fue causada por un aumento en la expansión celular, y no parecía haber ninguna diferencia obvia en el número de células. Sin embargo, el diámetro de los frutos de tomate producidos por las líneas RNAi *SIARF7* era comparable a la de las frutas de tipo salvaje (De Jong et al., 2009b, de Jong et al., 2011).

Un modelo - propuesto por Goetz et al. (2007)- sugiere que antes de la polinización, *SIARF8* forma un complejo inhibitor junto con una proteína Aux/ IAA, posiblemente la proteína *SIIAA9*, reprimiendo la transcripción de los genes de respuesta a auxina y genes de desarrollo de la fruta (Goetz et al., 2007). Durante la polinización, aumenta el nivel de auxina y las proteínas *SIIAA9* se ubiquitinaban y son degradadas rápidamente por el proteosoma 26S. En ausencia de *SIIAA9*, la

I. Introducción

transcripción de genes de respuesta a auxinas tempranas puede ser estimulada por SIARF8 junto con las señales y activadores adicionales, lo que resulta en el inicio de la fructificación (Ren et al., 2011).

Otro gen implicado es el gen *SIAUCSIA* que se expresa diferencialmente durante la síntesis de auxinas (en líneas *DefH9-IaaM*) en botones florales de plantas que producen frutos partenocárpicos. Su supresión está involucrado en el desarrollo vegetativo y reproductivo mostrando un fenotipo de desarrollo de frutos partenocárpicos con alteraciones vegetativa tales como hojas fusionadas y a su vez contorsionadas (Molesini et al., 2009).

La actividad de la auxina depende en muy alto grado de su transporte direccional célula a célula, facilitado por la familia de transportadores de auxinas, PIN. Se conoce ampliamente que el transporte polar de auxinas y el establecimiento de un gradiente de auxinas es crítico para determinar el patrón de crecimiento de las plantas (Feraru and Friml, 2008). Concretamente el gen *SIPIN4* juega un papel fundamental en la regulación de auxinas en frutos cuajados de tomate, posiblemente impidiendo el desarrollo del fruto precoz en ausencia de polinización (Pattison and Catalá, 2012). Se expresa predominantemente en la yema floral de tomate y en el fruto joven en desarrollo. Por medio de su silenciamiento se induce la formación de frutos partenocárpicos debido al desarrollo del fruto prematuramente antes de la fertilización (Mounet et al., 2012). El silenciamiento de *SIPIN4* también dio lugar a modificaciones en la morfología de los componentes florales y, en algunos casos, a un aumento de los números de carpelos. La producción irregular de semillas en estas líneas transgénicas probablemente se deriva de las alteraciones morfológicas de las flores, en el que se observan a menudo que el estilo sobresale por encima del cono estaminal. En ese caso, la autopolinización no se da debido a la protusión del estigma (Cheng and Zhao, 2007). Recientemente se ha sugerido que la auxina en si regula la expresión y localización de proteínas PIN, considerándose a esta familia de transportadores como el eje central en la integración de información que abarcan desde señales endógenas y exógenas hasta el control de la distribución de auxinas y así, de muchos aspectos del crecimiento y desarrollo (Adamowski and Friml, 2015).

Otro de los genes implicados en la vía de señalización auxina es un receptor de auxina llamado *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE-1 (TIR1)*. En presencia de auxinas, TIR1 recluta a las proteínas auxinas/indol-3-acético (Aux/IAA) que actúan como represores de la transcripción y activando su degradación por el proteosoma 26S. La degradación de proteínas represoras Aux/IAA libera los factores de respuesta auxina Aux/IAA unidos a factores de transcripción (*ARF*), iniciando de este modo la respuesta a través de la activación los genes de transcripción mediados por elementos sensibles a auxina (Salehin et al., 2015). El silenciamiento o disminución de la expresión del gen *TIR1* en tomate, así como los miembros específicos de la familia de genes Aux/IAA y ARF, altera el proceso de transición de flor a fruto y produciéndose el desacoplamiento del cuajado con polinización y la fertilización, dando lugar a frutos partenocárpico (Wang et al., 2005, De Jong et al., 2009b, Ren et al., 2011).

3.6. Genes implicados en la regulación de Giberelinas cuya alteración induce la formación de frutos partenocárpico

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas necesarias para la fructificación y desarrollo del fruto y están implicadas en la partenocarpia natural del tomate (George et al., 1984). Se sintetizan en los ápices de las raíces y en semillas en desarrollo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis). Las GAs pueden actuar como reguladores endógenos del crecimiento controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas como la germinación, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas y la inducción de la formación de flores y frutos (Pharis and King, 1985, Huttly and Phillips, 1995, Sponsel, 1995, Hedden, 1997). La aplicación exógena de GAs (como el ácido giberélico, GA₃) a un ovario de tomate no polinizado imita el efecto de la polinización provocando generalmente el desarrollo partenocárpico del fruto (Jacobsen and Olszewski, 1993, Fos et al., 2000). Al igual que ocurre para la auxina existen diferentes trabajos en los que se relaciona la partenocarpia con estas hormonas.

I. Introducción

El fenotipo partenocárpico *pat-1* parece estar mediado por la alteración en la expresión de diversos genes. Por un lado, la del gen *GA20oxidasasa-1*, implicada en la síntesis de GAs activas, está expresada constitutivamente en el mutante, mientras que durante el desarrollo normal en WT este gen no se expresa hasta después de la polinización y fertilización. Esta diferencia explica el alto contenido de GAs presente en el ovario en antesis y el desarrollo partenocárpico del fruto. Además, los genes *SPY*, *LeT6* y *LeT12*, implicados en el control de la síntesis de GAs cuya transcripción esta activada durante la antesis de manera normal, están reprimidos en este estadio en el mutante *pat-1*. Todo esto indica que la mutación *pat-1* afecta al control de la síntesis de GAs al principio de la cascada de regulación (Olimpieri et al., 2007).

En plantas de tomate cv MicroTom que sobreexpresan el gen *CcGA20ox1* del género Citrus se observó mayor crecimiento y alteraciones foliares como la pérdida de la forma serrada. Algunas de las flores presentaron longistilia impidiendo así la autopolinización. La floración se retrasó con respecto al genotipo WT no transformado y, el rendimiento y el número de frutos por planta, algunos de ellos sin semillas, fue superior en las plantas transgénicas. El contenido en sólidos solubles fue superior pero esto no se tradujo en un aumento del contenido de glucosas y fructosas. A pesar de que el incremento de GAs que provoca la sobreexpresión de *CcGA20ox1* (concretamente GA₄) induce un mayor rendimiento, solo se obtuvo una tasa de frutos partenocárpicos tras la emasculación del 14-30%, sin llegar a ser suficiente para obtener la partenocarpia completa (García-Hurtado et al., 2012).

El estudio detallado de los genes relacionados con hormonas en una línea partenocárpica de tomate cv UC82, ha permitido determinar que la alta concentración de GAs en los carpelos se debe a la sobreexpresión de la *GA20oxidasasa3*. La elevada concentración de GAs posibilita el cuaje del fruto en ausencia de polinización y fecundación. Este trabajo también reveló que la sobreexpresión del gen *ACO5* en la línea partenocárpica a lo largo de todos los estadios estudiados, alteraría la síntesis de etileno pudiendo influir en la síntesis de auxinas (Pascual-Bañuls, 2010).

También, el mutante *pro* de tomate con pérdida de función del gen *SIDELLA*, muestran un fenotipo de respuesta de giberelina constitutiva, incluyendo la partenocarpia (Martí et al., 2007, Carrera et al., 2012).

3.7. Genes relacionados con la síntesis de ABA

En el análisis de diferentes mutantes deficientes en ABA han demostrado valiosa hacia la aclaración del papel de ABA en el crecimiento del fruto. Se han descrito tres mutantes para la biosíntesis de ABA en tomate: *sitiens* (*SIT*), *flacca* (*FLC*), y *notabilis* (*no*) que carecen, respectivamente de, una ABA-aldehído oxidasa (Harrison et al., 2011), un sulfurasa de un cofactor de molibdeno (Sagi et al., 2002), y *9-cis dioxigenasa1 epoxi-carotenoide* (*NCEDI*) (Burbidge et al., 1999). Aunque los mutantes se han caracterizado a nivel molecular (Nitsch et al., 2012) llevaron a cabo la caracterización fenotípica de las líneas dobles mutantes *no/FLC*. Los frutos de estos mutantes dobles presentaron una reducción considerable de los niveles de ABA, y el tamaño del fruto y tamaño de las células se han reducido marcadamente, especialmente en el pericarpio. En este último aspecto, la consecuencia del aumento de los niveles de etileno, al tiempo que se reduce el del ABA, sugiere que el ABA estimula el crecimiento del fruto mediante la restricción de los niveles de etileno en frutos WT.

4. El Impacto de la salinidad y la sequía en la agricultura

El estrés abiótico puede definirse como la alteración en el metabolismo celular, inducido por factores abióticos, con efecto sobre la fisiología y desarrollo de las plantas. Estos factores abióticos principalmente son la luz (falta o exceso), temperaturas extremas (altas o bajas), agua (falta o exceso), concentración de iones, ya sean "no metálicos", como es el caso del Na^+ o "metálicos" como el Al^+ y contaminantes atmosféricos (O_3 , NO , etc). Diferentes problemas se derivan de la incidencia de estos factores en el cultivo del tomate en general, como la disminución de la producción y el rendimiento en un cultivo que, como ya se ha comentado, tiene un gran impacto a nivel nacional y mundial. Concretamente, la

I. Introducción

región del levante español se ha dedicado históricamente al cultivo del tomate, el cual representa una industria consolidada. Si bien esta industria supo desarrollarse para conseguir mejores productos, producciones y rendimientos en la zona, la coyuntura actual ha cambiado y entre los principales problemas a los que se enfrenta, se encuentran la alta salinización de las extensiones de cultivo debido al uso constante de abonos y derivados químicos, y la sobreexplotación de las aguas para riego en una región (catalogada como región semiárida) donde los recursos hídricos son limitantes, y de peor calidad, lo que se traduce concretamente a que los rendimientos de los cultivos de tomate actualmente se encuentran a la "baja" ya que están sometidos a una fuerte presión debido a la salinización y escasez de agua.

La acumulación de sales en los suelos cultivables se deriva principalmente del agua de riego de baja calidad y alta conductividad eléctrica que contiene significativas cantidades de cloruro de sodio (NaCl) y de la deposición de agua marina sobre la superficie terrestre por acción del viento o la lluvia (Li et al., 2011, Moghaieb et al., 2011). Las plantas exhiben dos efectos debido al impacto del estrés salino, el primero está relacionado con el estrés osmótico resultado del descenso del potencial hídrico del suelo salinizado, y el segundo está relacionado con la acumulación de iones citotóxicos que provocan un estrés de toxicidad iónica en el tejido foliar (Munns and Tester, 2008). Entre las diferentes estrategias desplegadas por la planta para contrarrestar estos efectos existen mecanismos para mitigar el estrés osmótico mediante la reducción de la pérdida de agua por la planta y tratar de minimizar los efectos nocivos del estrés por toxicidad iónica producido por la acumulación de Na^+ en la planta, aplicando mecanismos de exclusión del ion de tejidos foliares, o bien tratando de compartimentalizar éste a nivel intracelular, principalmente en vacuolas (Munns and Tester, 2008, Shabala, 2013).

En condiciones de estrés hídrico, la pérdida de agua por transpiración a través de las hojas excede a la absorción de la misma por parte de la raíz. Cuando la disponibilidad de agua en el suelo disminuye, consecuentemente baja la absorción de la misma y las plantas en respuesta limitan la transpiración cerrando

sus estomas. Con esta medida la planta evita exponer a sus células y tejidos al estrés osmótico, que implicaría la pérdida de turgencia y en casos severos, la muerte celular. Sin embargo, si el cierre de los estomas se prolonga en el tiempo, se reduce la captura de CO₂ y la planta se ve obligada a reducir su tasa fotosintética y, por tanto, su reserva de azúcares y otros fotoasimilados, llegando a afectar negativamente a su crecimiento, desarrollo y productividad (Farooq et al., 2009).

4.1. Respuesta al estrés osmótico inducido por salinidad y sequía

Las plantas han desarrollado la capacidad de detectar y responder tanto al componente osmótico presente en el estrés hídrico y salino, como al iónico debido a la acumulación de iones citotóxicos en el caso particular del estrés salino con el objetivo de responder de forma eficaz ante el estrés. Una escasa cantidad de agua y/o una alta concentración de sal en el suelo dificultan la absorción radicular de agua y produce estrés osmótico en las raíces.

Los reordenamientos metabólicos y las alteraciones en las rutas reguladoras que controlan los niveles de osmolitos son procesos fundamentales en la tolerancia al estrés, tanto hídrico como salino, en plantas. La acumulación de osmolitos orgánicos como prolina, glicina-betaína, polialcoholes, poliaminas, y de la superfamilia de proteínas LEA (del inglés Late Embryogenesis Abundant proteins, proteínas abundantes de la embriogénesis tardía), desempeñan un papel clave en el mantenimiento del potencial osmótico y en la prevención de los efectos nocivos del estrés por salinidad y sequía (Tarczynski et al., 1993, Verslues et al., 2006, Muñoz-Mayor et al., 2012). Los análisis moleculares han demostrado que el estrés salino estimula la síntesis de prolina (Székely et al., 2008, Sharma and Verslues, 2010). De forma similar a la prolina, la glicina-betaína es un osmolito orgánico usado por la planta para mantener la homeostasis osmótica en salinidad. Existen evidencias de que la glicina-betaína es un soluto compatible implicado en la protección de las principales enzimas del metabolismo y de estructuras subcelulares como las membranas (Raza et al., 2007, Guinn et al., 2011). Aunque se conoce que la glicina-

I. Introducción

betaína desempeña un papel vital en el mantenimiento de las actividades enzimáticas encaminadas a la eliminación de ROS (Chen and Murata, 2011), no existe evidencia directa que lo demuestre.

La manipulación de la tasa de síntesis, transporte o degradación de la sacarosa afecta al crecimiento, desarrollo y fisiología de la planta siendo un metabolito clave en tomate. Se ha descrito la acumulación de sacarosa en diferentes tejidos de la planta en respuesta a estrés abiótico y que esta acumulación juega un papel relevante en la osmorregulación así como en la señalización (Wind et al., 2010). La sacarosa es sintetizada en el citosol a partir del carbón fijado fotosintéticamente proveniente de las reservas de almidón o de los lípidos. La síntesis de sacarosa involucra a la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS), la cual cataliza la conversión de UDP-glucosa en sacarosa-6-fosfato y seguido, la enzima sacarosa fosfatasa convierte esta sacarosa-6-fosfato en sacarosa. La sacarosa es transportada desde los órganos fuente (hojas fotosintéticamente activas) hasta los órganos sumideros (raíces, ápice o frutos básicamente) a través del floema por medio de dos posibles vías, i) la vía de transporte a partir de plasmodesmos y células acompañantes, y ii) alternativamente puede ocurrir un paso intermedio en el transporte a través del apoplasto mediado por transportadores de sacarosa (Sauer, 2007) que posteriormente es importada a las células acompañantes por los transportadores de sacarosa (Turgeon and Wolf, 2009) hasta los órganos sumideros donde es descargada (**figura 8**). La descarga ocurre principalmente por la vía plasmodesmo-célula acompañante hasta las células sumidero. En paralelo, el transporte directo de sacarosa mediado por transportadores vía apoplasto hasta las células sumideros. En las células sumidero la sacarosa es hidrolizada a glucosa y fructosa por la enzima Invertasa de pared celular (CWINV- Cell Wall INVertase) y entrando en la célula a través de transportadores de hexosas. En los sumideros, la sacarosa que ha entrado vía plasmodesmos-celulas acompañantes, también puede ser almacenada en la vacuola y esto requiere transportadores de sacarosa localizados en el tonoplasto (Grennan and Gragg, 2009).

La sacarosa y las hexosas glucosa y fructosa producidas por su hidrólisis podrían influir en el desarrollo de la planta y la respuesta a estrés a través de la distribución

de carbono y la señalización intra- y supracelular (Roitsch and González, 2004). La sacarosa sintasa (SuSy; EC 2.4.1.13) y las invertasas (INVs; EC 3.2.1.26) son las dos enzimas que hidrolizan la sacarosa en sus hexosas para mantener la fuerza sumidero (Koch, 2004, Ruan et al., 2010). En base a su pH óptimo de actividad y localización subcelular, las INVs se clasifican en tres tipos: invertasa citosólicas/plastídicas/mitocondriales (CIN), invertasa vacuolar (VIN), y la invertasa de la pared celular (CWIN). Además de sus papeles críticos en el desarrollo (Wang et al., 2010), tanto VIN como CWIN juegan papeles relevantes en la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Roitsch et al., 2003, Essmann et al., 2008, Ruan et al., 2010).

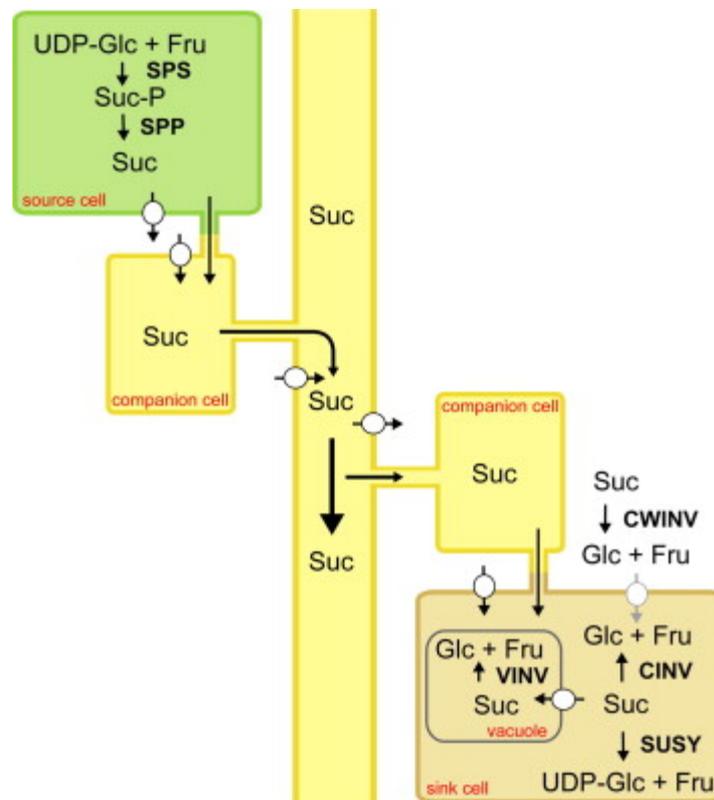


Figura 8. Síntesis, vías de transporte y mecanismos de degradación de la sacarosa.

Después de la síntesis en órganos fuente, la sacarosa es transportada al sumidero, donde se puede ser utilizada o almacenada. Transporte de sacarosa depende de los transportadores de sacarosa, como se indica por los círculos negros con flechas. El signo transportador gris claro representa a transportadores de hexosas. Las abreviaturas son: Suc, sacarosa; Fru, fructosa; Glc, glucosa; UDP-Glc, UDP-glucosa; SPP, sacarosa-fosfatasa; SPS, sacarosa-fosfato sintasa; SUSY, sacarosa sintasa; CWINV, invertasa pared celular; VINV, invertasa vacuolar; CINV, invertasas citosólicas / plastídicas / mitocondriales (adaptado de Wind et al., 2010).

El papel del Ca^{2+} como sensor de estrés es uno de los más estudiados, debido a que las plantas exhiben un rápido aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico tras segundos después de la exposición a NaCl o manitol (Hanson and Smeekens, 2009). Esta respuesta mediada por Ca^{2+} se origina en las raíces (Tracy et al., 2008) y tiene lugar en varios tipos de células diferentes en estos órganos (Kiegle et al., 2000, Martí et al., 2013). Esta observación ha llevado a la especulación de que el estrés osmótico inducido por sal y sequía puede ser detectado por un canal de Ca^{2+} cerrado mecánicamente (Kurusu et al., 2013). Por otra parte, diferentes estudios demuestran el papel de señalización del Ca^{2+} en la regulación del movimiento de estomas en condiciones de estrés (Roelfsema and Hedrich, 2010, Bates et al., 2012). En apoyo de la modalidad sensorial mecano-osmótica, encontramos que las mutaciones que afectan al desarrollo de la cutícula interfieren con muchas respuestas inducidas por el estrés osmótico, incluyendo la producción de ácido abscísico (ABA) (Wang et al., 2011). El estrés osmótico induce asimismo la producción de varios mensajeros secundarios a la señalización por Ca^{2+} como son los ROS (Jiang et al., 2013) y las anexinas (Laohavisit et al., 2012, 2013). Aunque el rápido aumento de Ca^{2+} es un sello distintivo de la respuesta al estrés osmótico, también pueden existir mecanismos sensoriales osmóticos independientes de Ca^{2+} . La identificación genética de estos sensores osmóticos será decisiva en el conocimiento de los mecanismos implicados en la respuesta al estrés abiótico (Deinlein et al., 2014).

4.2. Respuesta al estrés iónico inducido por salinidad

Existen múltiples vías de entrada de Na^+ en las raíces (Hasegawa, 2013). El Na^+ puede atravesar la membrana plasmática a través de canales y transportadores de nutrientes. Algunos mutantes para estos canales y transportadores reducen la acumulación de Na^+ en las células vegetales, pero sólo unos pocos mutantes han demostrado deteriorar directamente la entrada de Na^+ en las raíces. En *A. thaliana*, los canales no selectivos de cationes permeables a calcio (*NSCCs*) (Tyerman and

Skerrett, 1998, Tester and Davenport, 2003), los cuales incluyen a las familias *CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL (CNGC)* (Hua et al., 2003, Gobert et al., 2006, Guo et al., 2008) y *GLUTAMATE-LIKE RECEPTOR (GLR)* (Tapken and Hollmann, 2008), son permeables al Na^+ y, por tanto, representan un punto de entrada probable de Na^+ en la célula. En arroz (*Oryza sativa*), se ha demostrado que el transportador de Na^+ *OsHKT2.1* media la entrada de Na^+ a las raíces en condiciones de inanición de K^+ (Horie et al., 2007). Además, *AtCHX21*, un antiportador catión/ H^+ expresado en la endodermis de la raíz, está involucrado en el transporte de Na^+ a partir de células del endodermo de la estela (o cilindro vascular, situado en el centro) radicular (Hall et al., 2006).

El Na^+ entra en el xilema a través de las células estelares y, posteriormente, se transporta a la parte aérea. Los posibles candidatos para el control de la carga de Na^+ en el xilema son los canales de K^+ con rectificación hacia el exterior *KORC* y *NORC 50* y *51*. *AtSKOR*, un ortólogo de *KORC* en *Arabidopsis*, está involucrado en la carga de K^+ en el xilema (Gaymard et al., 1998). Además, los transportadores HKT clase I, de los que se hablará más adelante, tienen una función importante en la eliminación de Na^+ desde el xilema (Ren et al., 2005, Sunarpi et al., 2005). La homeostasis iónica durante el estrés por salinidad requiere el mantenimiento estable de la adquisición y distribución de K^+ , debido a que, entre otras funciones, puede contrarrestar el efecto tóxico provocado por la acumulación de Na^+ (Wang et al., 2013). Así, K^+ contribuye a mantener el estado hídrico de la planta, como soluto contribuyendo al ajuste osmótico, a la regulación estomática así como al estrés oxidativo provocado por estreses abióticos (Benlloch-González et al., 2012, Shabala and Pottosin, 2014).

4.3. Genes implicados en el transporte iónico

Se ha avanzado en la identificación de los transportadores de membrana relevantes que intervienen en la captación y distribución de Na^+ , pero aún hay un gran desconocimiento sobre la percepción, señalización y regulación del flujo de Na^+ en la planta (Maathuis, 2014). El antiportador *SOS1 (SALT-OVERLY SENSITIVE 1*,

I. Introducción

también conocido como *NHX7* se localiza en la membrana plasmática y está encargado de exportar Na^+ fuera de la célula (Qiu et al., 2002, Yamaguchi et al., 2013) y es uno de los tres componentes de la ruta SOS descrita en arabidosis y compuesta *AtSOS1*, *AtSOS2* (*AtCIPK24- A.thaliana CBL-Interacting Protein Kinase 24*) y *SOS3* (*CBL-Calcineurin B like*) (**figura 9**). En tomate se ha demostrado que *SOS1* promueve la extrusión de Na^+ fuera de la raíz. Concretamente, plantas silenciadas para *S/SOS1* fueron sometidas a condiciones salinas acumulando más Na^+ en raíces y hojas que sus respectivas plantas control tanto para condiciones de estrés salino moderado como severo. El análisis de los flujos de Na^+ y K^+ hacia órganos individuales indicó que este antiportador Na^+/H^+ posee un papel importante en la distribución de Na^+ a través de la planta de tomate (Olías et al., 2009). Por otra parte, también se ha descrito el papel *S/SOS2* en tomate, otro componente de la ruta SOS, y su implicación en la respuesta e estrés salino por medio de la obtención de líneas de sobreexpresión. *S/SOS2* presentó un 71% de homología con *AtSOS2*, y su sobreexpresión el tomate incremento los niveles de tolerancia de la línea, la cual manifestó un menor contenido de sodio en raíces y tallos, menor clorosis foliar, una mayor velocidad de crecimiento relativo y una floración más temprana que permitió, en última instancia, una mayor producción de frutos (Huertas et al., 2012, Belver et al., 2012).

Las proteínas de tipo NHX son importantes tanto para la homeostasis de Na^+ como de K^+ (Barragán et al., 2012). La sobreexpresión de *AtNHX1* en tomate aumenta el K^+ vacuolar, así como el transporte de K^+ desde la raíz a la parte aérea (Leidi et al., 2010, Bassil et al., 2011, Barragán et al., 2012), lo cual mejora la proporción de K^+/Na^+ intracelular, reduciendo el estrés debido al ion Na^+ . Por otra parte, *LeNHX3* de tomate ha sido asignado a un locus de rasgos cuantitativos (QTL) en relación con la acumulación de Na^+ en hoja (Villalta et al., 2008). Un trabajo reciente demuestra que los antiportadores vacuolares NHX desempeñan múltiples funciones en la osmoregulación, el crecimiento celular y desarrollo de las plantas (Bassil et al., 2011, Barragán et al., 2012), mientras que antiportadores NHX localizados en endosomas son cruciales para el crecimiento celular y podrían estar involucrados en el tráfico de vesículas, el procesamiento de proteínas y la

distribución de carga (Krebs et al., 2010). Se ha sugerido una implicación de las proteínas de transporte endosomales, incluyendo NHXs, en la tolerancia a la sal, mediante el control del pH del orgánulo y la homeostasis de iones (Yamaguchi et al., 2013) (**figura 9**).

Los *HKT* (*High K⁺ Transport*) son una familia de transportadores de cationes que se han identificado en varias especies, incluido tomate (Asins et al., 2013). Se han caracterizado varios tipos de *HKT* (Horie et al., 2009) subdivididos en dos clases: los transportadores clase I que median un transporte más selectivo para el Na⁺ y los de clase II, que co-transportan Na⁺ y K⁺ (Horie et al., 2009, Hasegawa, 2013). Con respecto a los transportadores tipo I, se conoce que la interrupción del gen que codifica para *AtHKT1.1* en *A. thaliana* provocó hipersensibilidad a sal, provocando una alta acumulación de Na⁺ en hojas y una reducción de la concentración en raíz (Berthomieu et al., 2003, Horie et al., 2006). Se ha demostrado que tanto *AtHKT1.1* como su ortólogo *OsHKT1;5* están implicados en la protección de las hojas para evitar la acumulación de niveles tóxicos de Na⁺ por medio de la eliminación de Na⁺ de la savia xilemática (Ren et al., 2005, Sunarpi et al., 2005, Horie et al., 2006, Davenport et al., 2007). Se ha comprobado que la sobreexpresión dirigida de *AtHKT1.1* en las células de la estela radicular potencia la tolerancia a sal (Møller et al., 2009) y media el transporte pasivo tipo canal de Na⁺. También ha sido sugerido que estimulan la carga indirecta de K⁺ en los vasos xilemáticos vía KORC provocando un descenso de la relación Na⁺/K⁺ en las hojas (Ren et al., 2005, Sunarpi et al., 2005). Diferentes estudios realizados para otras especies han sugerido mecanismos similares de descarga de Na⁺ desde el xilema, como en *O.sativa* (Ren et al., 2005) *Triticum turgidum* (James et al., 2006), y tomate donde se han identificado dos isoformas de los genes *HKT1* de clase I, que se han denominado *SIHKT1.1* y *SIHKT1.2*, ambas isoformas presentaron un patrón de expresión complejo, posiblemente debido a diferencias encontradas en sus secuencias promotoras. (Asins et al., 2013). Se ha postulado que ambas isoformas deben estar involucrado en la carga de Na⁺ en la savia floemática en hojas y descarga en órganos sumideros, como la fruta y la raíz (Asins et al., 2015), lo que estaría en

línea con la hipótesis planteada por Berthomieu et al. (2003) para *AtHKT1;1* el cual parece jugar un papel importante en la carga de Na^+ en el floema (**figura 9**).

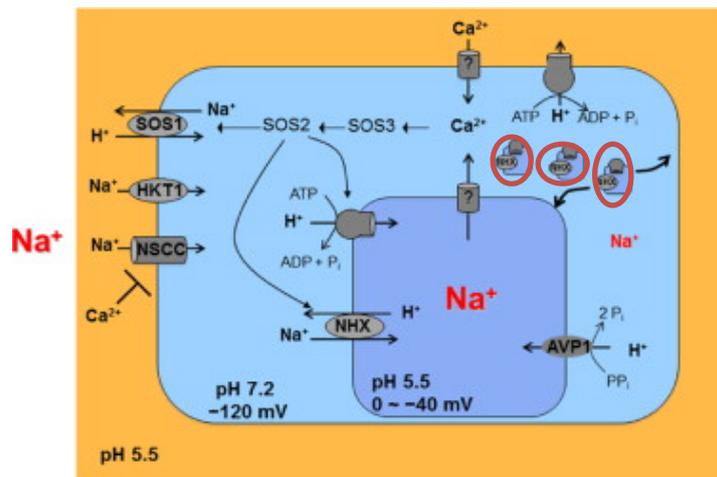


Figura 9. Principales proteínas y mecanismos de transporte que facilitan la homeostasis intracelular de Na^+ a niveles altos de Na^+ (Hasegawa, 2013). Las bombas de H^+ en la membrana plasmática (ATPasa de tipo P) y tonoplasto (ATPasa de tipo V y AVP1 pirofosfato) generan un potencial electroquímico de H^+ principalmente responsable del gradiente de pH y los potenciales de membrana (membrana plasmática y tonoplasto). Estas bombas acoplan la energía de la hidrólisis de ATP al transporte de H^+ a través de membranas. La absorción de Na^+ intracelular se produce a través de canales de cationes no selectivos (NSCC), el transportador de Na^+ *HKT1* y sistemas de captación de K^+ alta afinidad por flujo electroforético debido al gradiente de concentración de Na^+ . Aún se desconoce la identidad molecular de las proteínas NSCCs. La alta concentración de NaCl aumenta Ca^{2+} citosólico por la absorción del apoplasto o liberación de la vacuola y otros compartimentos de almacenamiento intracelular. El Ca^{2+} se une a *SOS3* y facilita la interacción con la proteína quinasa ser/thr *SOS2* activandola. El complejo *SOS2-SOS3* se asocia con la membrana plasmática y *SOS2* fosforila *SOS1* que se activa (antiportador Na^+/H^+) promoviendo el flujo de salida de Na^+ por transporte activo secundario. La reducción dependiente de Ca^{2+} en la conductancia de Na^+ a través de NSCCs, la activación de la vía de SOS, y la mejora de la captación neta de alta afinidad K^+ restringen la absorción de Na^+ en las células y facilita la homeostasis K^+/Na^+ . *SOS2* activa tanto a la ATPasa vacuolar (V-ATPasa) como a *NHX* (antiportador vacuolar Na^+/H^+), que internalizan el Na^+ en vacuolas. La pirofosfatasa vacuolar (AVP1) también transporta H^+ al lumen vacuolar para establecer potencial electroquímico. Una V-ATPasa y un antiportador tipo *NHX* están involucrados en compartimentación del Na^+ en los endosomas (en círculo rojo) que sirven como pre-vacuolas o vesículas de exocitosis. La compartimentación de Na^+ en vacuolas y endosomas facilita el ajuste osmótico y desintoxica el citoplasma. La coordinación de la función de transporte de proteínas en la membrana plasmática y el tonoplasto restringe la absorción intracelular neta de Na^+ a una tasa que se encuentra dentro de la capacidad de compartimentación de Na^+ para las células, lo que limita su acumulación en el citoplasma.

5. La familia Wall-Associated Kinase (WAK) y su papel en procesos de desarrollo y tolerancia a estrés

Las proteínas WAKs son una subfamilia de proteínas que forman parte de la familia de Receptores Tipo Kinasa o *RLK* (Receptor Like Kinase), incluida en la superfamilia de Proteínas Kinasas o *ePK*, y comprenden todas las proteínas kinasas identificadas en eucariotas, las cuales juegan un papel importante en la modificación post-traducciona l de proteínas a través de fosforilación (de Oliveira et al., 2014). Concretamente, la familia de proteínas tipo RLK está involucrada en un amplio rango de procesos, como la señalización hormonal (Osakabe et al., 2005, Afzal et al., 2008, Chae et al., 2009), desarrollo de órganos (Clark et al., 1997, De Smet et al., 2008, Germain et al., 2008), reproducción (Sharp et al., 2004, Mizuno et al., 2007, Colcombet and Hirt, 2008, Fulton et al., 2010), simbiosis (Stracke et al., 2002), nodulación (Indrasumunar et al., 2011), así como en estrés biótico y abiótico (Lehtishiu et al., 2009, Coca and San Segundo, 2010, Asano et al., 2011).

Las proteínas WAK son proteínas transmembrana localizadas en la membrana plasmática con un dominio citoplasmático Kinasa, tipo Ser/Thr y un dominio extracelular tipo EGF (Epidermal Grow Factor) de vertebrados que interaccionan fuertemente con las pectinas, componente esencial de la pared celular, destacando las pectinas de oligo-galacturónidos (OG) que son pectinas fragmentadas que conforman la pared celular (Wagner and Kohorn, 2001, Decreux and Messiaen, 2005, Kohorn et al., 2006b, 2009, 2012, 2014). En los primeros trabajos llevados a cabo para las proteínas WAKs se observó una acumulación de proteínas WAKs en vesículas que contenían pectinas, las cuales migraban hacia la membrana plasmática. Además, se pudo comprobar la existencia de interacción entre proteína AtWAK1 y la proteína estructural de pared celular, GPR3 (Park et al., 2001). En otro trabajo similar realizado en protoplasto de células foliares de *A.thaliana* portando una construcción de fusión *AtWAK1-GFP*, se observó igualmente que estas proteínas eran acumuladas en compartimentos citosólicos que contienen pectinas, y cuyo origen era el aparato de Golgi, que migraban hacia la pared celular siendo requeridas para la correcta síntesis de la pared celular (Kohorn et al., 2006a). Posteriormente, usando una quimera formada por *AtWAK1* y

I. Introducción

EFR, un receptor para reconocimiento del patrón molecular asociado al microbio EF-Tu, se demostró que la proteína AtWAK1 es un receptor de OG *in vivo* (Brutus et al., 2010).

La importancia de las pectinas radica en los múltiples papeles que juegan en la pared celular, siendo necesarias para la expansión de raíces y tubo polínico (Bosch and Hepler, 2005, Rojas et al., 2011), así como en la expansión de células, incluso como soporte de carga junto con la celulosa (Rojas et al., 2011). El tipo y la concentración de pectinas presente en la pared celular conducen a una activación de diferentes vías de señalización, ambas dependientes de proteínas tipo WAK, distinguiéndose una vía de respuesta basada en la expansión de pectinas nativas y otra vía de respuesta a OG relacionadas con las alteraciones de la pared celular. La vía asociada a la expansión de pectinas se ha asociado al papel de las WAKs en el desarrollo y conlleva la activación de una Mitogen Activated Kinase Protein, concretamente MAPK-3 (Kohorn et al., 2009) y la invertasa vacuolar regulando el metabolismo de azúcares, presión de turgencia y siendo requeridos para la expansión celular (Wang et al., 2001, Kohorn et al., 2006a)

También se ha mostrado como la reducción de la expresión de genes WAKs lleva a una reducción en el crecimiento celular (Wagner and Kohorn, 2001, Kohorn et al., 2006b, Kohorn et al., 2009). En un trabajo realizado en *A. thaliana* usando un promotor inducible por glucocorticoides (Dexametasona) para controlar la expresión de un gen antisentido *AtWAK4*, se indujo la expresión de este gen provocando una disminución significativa de proteínas WAK, deterioro de la elongación celular y posterior bloqueo del desarrollo de las raíces laterales (Lally et al., 2001). En arroz, el silenciamiento génico de *OsWAK1* produjo plantas enanas debido a la reducción de hojas, internudos y pináculos. Igualmente se vio afectado el desarrollo del primordio radicular durante la germinación, los pelos radiculares y las raíces laterales. El análisis microscópico reveló que la reducción del crecimiento se debió a una reducción en el tamaño celular pero no del número de células (Li et al., 2009). En la especie *Hordeum vulgare* se ha descrito *HvWAK1* como un gen específico de raíz que, igualmente, está implicado en la regulación del crecimiento

radicular (Kaur et al., 2013). Todos estos resultados juntos demostraron la implicación de los genes WAKs en la elongación celular y el desarrollo de la planta.

5.1. Papel de los genes WAKs en la tolerancia a estrés biótico y abiótico

Hay bastantes evidencias en *Arabidopsis* y arroz (*O. sativa*) que demuestran el papel de esta familia de genes en la tolerancia al estrés biótico. Así, en *A. thaliana* se ha demostrado que la expresión de *AtWAK1* fue inducida de forma dependiente del gen *Non-expresor of Pathogenesis Related (NPR)-1* por el patógeno *Pseudomonas syringae*, así como por la aplicación exógena de ácido salicílico (SA), siendo esta expresión requerida para proteger las plantas de niveles letales de SA (He et al., 1998). También se conoce que la transcripción de *AtWAK1* es activada por las condiciones inductoras del SAR (*Sistemic Acquired Resistance* o Resistencia Sistémica Adquirida), por el patógeno fúngico *Alternaria brassicicola* y otras moléculas señalizadoras relacionadas con la defensa como el metil jasmonato y el etileno (Schenk et al., 2000). Recientemente, Kohorn et al., (2014) han comprobado que la respuesta inducida en un mutante doble con un alelo hiperactivo dominante (*AtWAK2cTAP*), que provoca un fenotipo de estrés caracterizado por presentar un retraso en el crecimiento y necrosis, es dependiente de los genes *EDS1* y *PAD4*. En diferentes condiciones de estrés, estos genes son modificadores transcripcionales que se encuentran aguas abajo (Wagner et al., 2013). Otro trabajo demuestra que *AtWAKL10* puede actuar en respuesta a estrés biótico de forma coordinada con genes relacionados con la defensa vegetal, siendo este gen dependiente del segundo mensajero Guanosil Monofosfato Cíclico (cGMP) (Meier et al., 2010). El cGMP es un mensajero secundario que regula cascadas de señalización complejas a través de efectores inmediatos corriente abajo (Maathuis, 2006).

En arroz, un análisis transcriptómico entre dos cultivares infectados por el hongo *Magnaporthe oryzae*, uno resistente y otro susceptible, permitió identificar 15 *OsWAKs* que incrementaban su expresión en el genotipo resistente, mientras que en el genotipo susceptible sólo 4 WAKs fueron sobreexpresados y otros 4 redujeron su expresión (Bagnaresi et al., 2012). En otro análisis transcriptómico también se

I. Introducción

observó que 18 de los 36 genes expresados diferencialmente que codifican para genes tipo *OsWAKs* eran significativamente sobre-expresados en respuesta a la infección bacteriana en un cultivar de arroz resistente (Narsai et al., 2013). Con el objetivo de identificar genes compartidos de respuesta a estrés abiótico y biótico, Shaik and Ramakrishna (2014) analizaron 559 muestras de microarrays (219 de estrés abiótico y 340 de estrés biótico) correspondientes a 13 condiciones de estrés, siete de estrés abiótico (frío, sequía, choque térmico, metales, nutrientes, sales y anoxia) y seis de biótico (bacteria, hongos, insectos, nemátodos, virus, y de malezas). Entre los resultados, cabe destacar un número importante de familias de genes implicados en la síntesis y modificaciones de la pared celular que mostraron distintos patrones de expresión para estrés abiótico y biótico. Concretamente, seis genes tipo *OsWAK* eran expresados diferencialmente (de 144 genes presentes en la especie *O.sativa* para esta subfamilia de genes), reduciendo la expresión en estrés abiótico e incrementándola en estrés biótico.

La respuesta a estrés de estas proteínas se ha asociado a la vía de respuesta activada por OGs, que interactúa respectivamente con las proteínas Kinasas MPK-6, MPK-3 y otras proteínas relacionadas con el estrés (Kohorn et al., 2012). Además, se ha sugerido recientemente que las proteínas WAKs pueden interactuar distinguiendo el estado de las pectinas en la pared celular en base al estado de metil-esterificación de las mismas y quizás en base al tamaño de la molécula de pectina, activándose una vía de respuesta u otra en función del estatus de sus pectinas (Kohorn et al., 2014).

Interesantemente, también existen evidencias de que estos genes están implicados en procesos de estrés abiótico. En *A. thaliana* se ha descrito la inducción de la expresión de *AtWAK1* en raíz (en la periferia de células corticales en la zona de elongación del ápice radicular) como respuesta a la exposición al estrés por Aluminio (Sivaguru et al., 2003). En otro trabajo donde se utilizó una línea con una inserción de T-DNA a 40 pb aguas arriba del codón de inicio de *AtWAKL4*, se ha demostrado que la expresión *AtWAKL4* se induce por Na^+ , K^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} (Hou et al., 2005). Es interesante señalar que, mientras que la inserción de T-DNA no tuvo prácticamente efecto sobre los niveles de transcripción *AtWAKL4* en

condiciones control, el patrón de expresión de *AtWAKL4* se alteró significativamente en condiciones de estrés.

En resumen, la familia WAK juega un papel importante en la respuesta a estrés, tanto biótico como abiótico. Un claro ejemplo de ello se observa en el gen *AtWAK1* que está implicado en el desarrollo, estrés biótico y abiótico (He et al., 1998, Schenk et al., 2000, Park et al., 2001, Sivaguru et al., 2003, Kohorn et al., 2006a, Brutus et al., 2010), así como en el gen *OsWAK1* implicado en la resistencia a patógenos (Bagnaresi et al., 2012) así como al estrés por metales pesados (Li et al., 2009).

6. Colecciones de mutantes como herramienta genómica para la identificación de genes implicados en la respuesta a estrés abiótico

Uno de los objetivos centrales de la biología vegetal es obtener una comprensión clara del control genético de los procesos implicados tanto en el desarrollo vegetal *per se* cómo de los procesos que permiten la adaptación a condiciones no óptimas para el crecimiento. Con estos objetivos se han desarrollado numerosas estrategias que han permitido el avance en el conocimiento del control y la regulación génica. Desde el punto de vista biotecnológico, el tomate contiene un genoma relativamente pequeño y ha sido seleccionado como la especie de referencia para la secuenciación del genoma de solanáceas. Además de la disponibilidad de una serie de recursos genómicos, que incluyen enfoques transcriptómicos (Fei et al., 2004, TFGD, 2015), y metabolómicos (Moco et al., 2006), están disponibles grandes colecciones de recursos genéticos para diseccionar la bioquímica y las vías metabólicas en tomate (TGRC). En los últimos años, el programa de secuenciación del genoma de muchas especies de plantas (AGI, 2000, Giovannoni, 2004, Khurana and Gaikwad, 2005, Jaillon et al., 2007), incluyendo el tomate (TGC, 2012) ha puesto a disposición un gran número de secuencias de genes en bases de datos públicas que posteriormente ha fomentado el desarrollo de nuevos enfoques. Uno de los enfoques más explotados ha sido la generación de colecciones de mutantes insercionales para inactivar genes en tomate.

I. Introducción

Existen dos tipos de aproximaciones para identificar y analizar funcionalmente genes dentro de una colección de mutantes; La aproximación directa y la aproximación inversa. De forma tradicional se ha empleado la Genética Directa o Clásica (Forward Genetics) que se basa en la detección de un fenotipo mutante dentro de una colección de mutantes, a partir del cual se analiza el genotipo con el objetivo de identificar y caracterizar el gen que causa el fenotipo alterado. Como consecuencia de los recientes avances en biotecnología, se ha desarrollado otro enfoque denominado Genética Reversa (Reverse Genetics), mediante la cual, a partir de la secuencia de un gen y su introducción en el genoma de un organismo, se estudia el cambio resultante en el fenotipo. La combinación de ambas aproximaciones supone una estrategia genómica muy útil y relevante en la identificación de los genes involucrados en distintos procesos, como pueden ser los mecanismos de respuesta y tolerancia a estrés abiótico (Østergaard and Yanofsky, 2004, Ahuja et al., 2010, Sheldon and Roessner, 2013) El análisis de mutantes en tomate ha permitido grandes avances en la disección genética de diversos procesos como son el desarrollo y maduración de fruto entre otros (Giovannoni, 2007, Carvalho et al., 2011a, Okabe et al., 2011, Saito et al., 2011).

Mediante los avances en genómica y la investigación con mutantes, se han identificado genes relacionados con la tolerancia a estreses abióticos (Atarés et al., 2011, Varshney et al., 2011). Este es el caso de los genes *SOS* (*Salt Overtly Sensitive*), que fueron aislados y caracterizados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Estos genes *SOS* están involucrados en una ruta de señalización responsable de la homeostasis celular del Na⁺ y del K⁺ y se relacionan directamente con la tolerancia a la sal (Shi et al., 2002). Sin embargo, el número de mutantes en otras especies que se encuentran disponibles para los investigadores es escaso y hace necesario generar colecciones de mutantes para disponer de los materiales adecuados para aplicar estas estrategias genómicas. La mutagénesis tanto química, mediante agentes como el Etil Metano Sulfonato (EMS), como física, mediante el uso de rayos X, rayos γ o neutrones acelerados, son soluciones que se han aplicado para obtener dichas colecciones (Vij and Tyagi, 2007, Atarés et al., 2011, Pineda et al., 2012).

Aunque ambos tipos de colecciones producen mutaciones con elevada frecuencia y generan un amplio perfil de variación genética, la principal dificultad del escrutinio de mutantes espontáneos o generados por mutagénesis química o física consiste en la localización genómica de la mutación responsable del fenotipo, una vez identificados los mutantes de interés. La estrategia del clonaje posicional es un proceso largo y lento que requiere un gran esfuerzo e inversión de personal, equipamientos e instalaciones, incluso considerando la aplicación combinada de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva como la re-secuenciación del genoma (WGR, Whole Genome Resequencing) que pueden acelerar significativamente el proceso. Una alternativa muy interesante para superar esta barrera metodológica consiste en aplicar la mutagénesis insercional que ofrece una manera efectiva de aislar genes de plantas mediante la localización de la mutación producida como resultado de la inserción.

6.2. La mutagénesis insercional: el etiquetado de los genes mutados.

La mutagénesis insercional es una herramienta genómica de enorme utilidad para la identificación y análisis funcional de genes, no sólo es óptima en la generación y escrutinio de mutantes sino que además facilita enormemente la localización genómica de la mutación de interés, y ello es debido al etiquetado del gen endógeno responsable del fenotipo observado en el mutante (Jeon et al., 2000, Atarés et al., 2011, Pineda et al., 2012). Este tipo de mutagénesis se basa en la inserción en el genoma de construcciones genéticas con elementos móviles de trasposición, tales como transposones (Martienssen, 1998) o T-DNA (Azpiroz-Leehan and Feldmann, 1997). Estos elementos de trasposición funcionan como mutágenos, pues al integrarse en secuencias reguladoras o codificantes, generan mutantes insercionales con pérdida de función, ganancia de función o alteración de los niveles de expresión génica (Krysan et al., 1999, Martienssen, 1998, Kuromori et al., 2009). Los transposones o T-DNA, además de alterar la expresión del gen donde se insertan, actúan como un marcador de la mutación, quedando así el gen etiquetado. Mediante esta técnica se facilita enormemente la identificación del gen, pues al conocerse las secuencias de los elementos insertados se pueden aplicar

técnicas basadas en la PCR para clonar las secuencias flanqueantes genómicas donde se ha producido la inserción (Krysan et al., 1999, An et al., 2003, Kuromori et al., 2009). En ocasiones esta herramienta genómica puede no ser efectiva. Este es el caso de genes que son redundantes en su función y su mutación puede producir un fenotipo difícilmente reconocible, genes que se expresan en muchos estados de desarrollo diferentes y cuyas mutaciones pueden ocasionar una letalidad temprana y genes que cuando son alterados dan lugar a fenotipos muy dúctiles difícilmente detectables (Jiang and Ramachandran, 2010, Pineda et al., 2012). Para suplir esta desventaja se emplea en la mutagénesis insercional otra herramienta genómica denominada trampas génicas, con el fin de monitorizar los patrones de expresión del gen mutado que puede contribuir grandemente a identificar su función.

Existen varios tipos de trampas génicas: trampa de genes, trampa de intensificadores y trampa de promotores. Estas trampas actúan como mutágenos de inserción pero adicionalmente llevan incorporado la secuencia de un gen delator, de tal forma que si el inserto se coloca en la posición adecuada, el gen delator quedará bajo el control de los elementos reguladores del gen etiquetado. De esta forma, siguiendo el patrón de expresión del gen delator se puede monitorizar fácilmente el patrón de expresión del gen endógeno que ha sido etiquetado por la trampa (Jiang and Ramachandran, 2010, Pineda et al., 2012). El gen bacteriano *uidA* que codifica para la enzima *β -glucuronidasa*, es el gen delator más utilizado en los sistemas de trampas génicas para plantas, pues es un marcador eficiente, fiable y puede ser visualizado de forma fácil por tinción histoquímica (Martienssen, 1998, Springer, 2000, Jiang and Ramachandran, 2010). Por todo lo anterior los sistemas de trampas génicas son de gran utilidad en la identificación de genes relaciones con tolerancia al estrés salino y facilitan el proceso de escrutinio de colecciones de mutantes de inserción alterados en el nivel de tolerancia al estrés hídrico o salino (Pineda et al., 2012).

6.3. Etiquetado mediante *trapping*

Mediante esta estrategia se intenta explotar la posibilidad de obtener información sobre la función génica a partir de datos relacionados con la expresión. La técnica

consiste en introducir construcciones que se insertan al azar en el genoma. Dependiendo del tipo de construcción estas pueden portar, aparte del gen marcador, un gen delator con un promotor mínimo, un gen delator sin promotor o unido a un sitio aceptor de *splicing*. Por tanto, se trata de analizar las secuencias genómicas junto a las que se inserta la construcción y las propiedades de expresión que confieren éstas al gen delator. Evidentemente, tras la detección de secuencias reguladoras capaces de conferir al gen delator un patrón de expresión, el conocimiento de la secuencia de la construcción insertada permite clonar las secuencias genómicas en las que se ha insertado. La identificación del gen endógeno es aún más sencilla si se conoce la secuencia completa del genoma. El delator más comúnmente utilizado es el gen bacteriano *uidA* que codifica para la enzima β -glucuronidasa, que en contacto con el reactivo X-Glu, lo degrada, produciéndose una tinción azul característica. El principal inconveniente que plantea el uso de esta técnica es el coste relativamente alto esperado para el análisis de un elevado número de plantas. Otra alternativa es el uso de la proteína verde fluorescente (*GFP*) (Haseloff et al., 1997) o del gen *Lc* de maíz (Goldsbrough et al., 1996). Sin embargo, por comparación, la observación microscópica de la tinción GUS es tremendamente más sensible que la de otros genes delatores ya que permite su detección en unas pocas células (Lindsey et al., 1993, Sundaresan, 1996, Campisi et al., 1999, He et al., 2001). Existen tres tipos de trampas génicas que usualmente se denominan como trampas de intensificadores, promotores y genes (Springer, 2000):

- *Trampa de intensificadores*. consiste en un T-DNA sencillo que, aparte del gen de selección, contiene un promotor mínimo (caja TATA + inicio de transcripción) al que se encuentra fusionada la región estructural del gen *uidA* (gen delator) justo al lado del borde derecho. El promotor mínimo no es capaz de promover un nivel de transcripción detectable, pero su inserción en el área de actuación de un determinado intensificador, y en el sentido correcto, activa la expresión del delator, mimetizando el patrón de expresión que dicho intensificador confiere al gen endógeno. Es decir, permite identificar y analizar el patrón de expresión de un gen (y por tanto llegar a una inferencia sobre su función) analizando la expresión del delator.

I. Introducción

-*Trampa de promotores*: es idéntica a la anterior, pero no contiene el promotor mínimo. Para que funcione, el T-DNA debe insertarse dentro de uno de los exones de un gen.

-*Trampa de genes*. contiene un sitio aceptor de *splicing* justo antes de la región estructural del delator, de forma que sólo funciona cuando el T-DNA se integra dentro de un intrón.

Cada tipo de trampa tiene sus ventajas e inconvenientes. El principal inconveniente en lo que respecta a las trampas de promotores y de genes, es que el número de genes que van a detectarse es menor, ya que para que funcionen deben integrarse dentro de un exón o de un intrón, respectivamente. La principal ventaja es que el gen en cuestión queda estrictamente etiquetado y además, si se produce una fusión traduccional (producto del delator-producto total o parcial del gen endógeno) no sólo puede hacerse el análisis funcional del gen, sino que además pueden obtenerse datos de la localización intracelular del producto del gen endógeno. La ventaja de la trampa de intensificadores es que el número de genes que se detectan es mayor (Kertbundit et al., 1991, Topping and Lindsey, 1995), ya que para que funcione basta que se inserte el T-DNA en el área de actuación de un intensificador. El principal inconveniente es que puede funcionar a una distancia considerable, lo que implica el esfuerzo requerido puede ser mayor a la hora de clonar el gen pudiendo resultar difícil localizar la secuencia genómica responsable del patrón de expresión. No obstante, otro aspecto que merece tenerse en cuenta es la versatilidad de la trampa de intensificadores, ya que puede actuar como una trampa de promotores, cuando se inserta dentro de uno de los exones del gen, o como una trampa de genes, cuando se inserta dentro de un intrón.

Con independencia del tipo de trampa elegido, el empleo de trampas tiene grandes ventajas sobre la mutagénesis insercional en *sensu stricto* (i.e. con un vector convencional) al permitir la identificación de genes: i) funcionalmente redundantes; ii) los que se expresan en múltiples estados de desarrollo y producen efectos pleiotrópicos que generan confusión al llevar a cabo el fenotipado; iii) aquellos cuya disrupción provoca letalidad temprana; y iv) genes cuya disrupción ocasiona un fenotipo tan sutil que a veces no llega a detectarse en el fenotipado de las plantas (en este caso, la expresión del delator da una pista para identificar el

fenotipo durante la evaluación). La identificación del gen es, además, independiente del nivel de expresión del mismo, evitando el peligro de descartar genes de baja expresión pero con efectos muy relevantes (Liu et al., 2002), tal y como a veces ocurre cuando se emplean otras aproximaciones, como por ejemplo las de tipo transcriptómico. En resumen, es un método ideal para detectar genes que se activan o inactivan en respuesta a un estímulo externo o situaciones de estrés abiótico.

El interés de esta estrategia reside en la naturaleza dual de las trampas, ya que por un lado generan mutaciones de inserción de T-DNA y por otro permiten estudiar el patrón de expresión del gen etiquetado. De esta forma, no sólo se pueden hacer inferencias en torno a la función del gen etiquetado en un determinado mutante de inserción a través del fenotipado en TG1 o TG2, sino que también se puede obtener un panorama bastante preciso en torno al patrón de expresión espacio-temporal de dicho gen. Se han utilizado con éxito dos tipos de trampas: las mediadas por T-DNA (Kertbundit et al., 1991, Topping and Lindsey, 1995, Campisi et al., 1999) y las mediadas por transposones (Fedoroff and Smith, 1993, Klimyuk et al., 1995, Sundaresan, 1996). En ambos sistemas, la presencia de un alto número de copias insertadas en distintas regiones del genoma complica la identificación de las secuencias de interés y, en ciertos casos, la interpretación de los patrones de expresión.

Análisis preliminares de colecciones de plantas con sistemas de trampas génicas han conducido a la identificación de genes y secuencias reguladoras específicas, por ejemplo, de raíces laterales (Malamy and Benfey, 1997), embriones en desarrollo (Topping and Lindsey, 1997), tejidos infectados por nematodos (Barthels et al., 1997), células guarda (Plesch et al., 2000) o células en proceso de senescencia (He et al., 2001). El gen *PROLIFERA* (*PRL*) de *Arabidopsis* se identificó a través de *trapping* (Springer, 2000). La expresión del gen delator *uidA* en células en división ofreció las primeras pistas sobre la posible función de *PRL* (codifica una proteína de la familia MCM relacionada con la iniciación de la replicación del DNA). De hecho, este gen habría sido difícilmente identificado mediante métodos convencionales ya que su disrupción, como pudo comprobarse en plantas con la inserción del elemento transponible *Ds* en el gen, causa letalidad en distintos

I. Introducción

estadios de desarrollo del embrión y megagametofito. Una vez aislado el gen, su secuencia resultó plenamente consistente con la función que se la había atribuido. Otros genes identificados a través de este método han sido *FRUITFULL (FUL)* (Gu et al., 1998), *POLARIS (PLS)* (Casson et al., 2002), *LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB)* (Shuai et al., 2002) y *EXORDIUM (EXO)* (Farrar et al., 2003). Por otro lado, los sistemas basados en el empleo de trampas han permitido la clonación de promotores específicos de embriones (*Arabidopsis* (Topping et al., 1994)), de la cubierta de la semilla (tabaco; (Fobert et al., 1994)) de tejidos vasculares (*Arabidopsis*; (Wei et al., 1997)), de células guarda (Plesch et al., 2000), de raíces (*Arabidopsis*, (Mollier et al., 2000)) y (*Lotus japonica*, (Webb et al., 2000)), de tejidos en crecimiento y hojas jóvenes (*Arabidopsis*, (De Greve et al., 2001)) y de células meristemáticas (*Arabidopsis*, (Farrar et al., 2003)). En la actualidad, existe una amplia colección de líneas *trapping* (es decir, generadas con trampas génicas) en *Arabidopsis* (Sundaresan et al., 1995, Campisi et al., 1999, Alvarado et al., 2004), arroz (Jeon et al., 2000, Jensen et al., 2002, Wu et al., 2003, Sallaud et al., 2004, Peng et al., 2005, Yang et al., 2005), álamo (Groover et al., 2004), tomate Microtom (Meissner et al., 2000) y *Solanum pennelli* (Atarés et al., 2011).

En nuestro laboratorio se está abordando un proyecto en colaboración con los grupos del Dr. Vicente Moreno (IBMCP-UPV, Valencia) y los Dres. Rafael Lozano y Trinidad Angosto (Universidad de Almería) en el que estamos utilizando mutagénesis insercional mediante trampa de intensificadores (*enhancer trapping*) en tomate (cv. Moneymaker). El principal objetivo es identificar secuencias codificantes o elementos de regulación de genes implicados en procesos del desarrollo vegetativo (arquitectura de la planta) y reproductivo (flor y fruto), así como en dos tipos de estreses abióticos (salinidad y estrés hídrico).

Hasta la fecha, se han generado más de 3500 líneas de T-DNA de tomate (Pineda et al., 2012). Por lo que respecta a la identificación de genes implicados en estrés abiótico, el análisis preliminar de una muestra de esta colección de líneas T-DNA ha conducido a la identificación de varios mutantes con diferente grado de sensibilidad al estrés salino (Cuartero et al., 2009) (Pineda, 2012 #319). En definitiva, la identificación de mutantes de inserción alterados en el grado de tolerancia a salinidad puede ser particularmente útil para identificar genes esenciales implicados

tanto en desarrollo vegetativo y reproductivo como en los diferentes mecanismos de tolerancia a salinidad y sequía.

En esta Tesis Doctoral se presenta la identificación y la caracterización fenotípica, genética y fisiológica de dos mutantes de tomate:

i) un mutante que hemos denominado *afs1* (*abnormal fruit set 1*) por su fenotipo que presenta mayor tasa de crecimiento, así como mayor tasa de cuajado de frutos que promueve la mejora del rendimiento en la línea mutante. Los frutos producidos son partenocárpicos y presentan mejores cualidades organolépticas. Todas estas características convierten a este mutante en un mutante de alto interés agronómico. La mutación responsable del fenotipo no está etiquetada por un inserto de T-DNA pero debe de afectar a la regulación hormonal del cuaje de fruto.

ii) un mutante de inserción que presenta susceptibilidad al estrés abiótico (salinidad y sequía) y donde la mutación responsable está etiquetada por un inserto T-DNA que se localiza en la región promotora para un gen WAK, hecho que además ha permitido la caracterización molecular del mutante el cual se ha denominado *wak1* (*wall associated kinase 1*). Este mutante es fenotípicamente indistinguible del tomate no transformado de la variedad donde se ha generado la colección de mutantes insercionales (Moneymaker) cuando se cultiva en condiciones estándar sin estrés. Bajo condiciones de estrés se ha observado un comportamiento dual, por una parte, se muestra sensible al efecto osmótico provocando la reducción del crecimiento que en última instancia lleva a la reducción del rendimiento de frutos por planta, mientras que por otra parte, se muestra tolerante al efecto iónico, acumulando menos cantidad de Na⁺ en la parte aérea. La sensibilidad al efecto osmótico se ha relacionado con alteraciones en la capacidad de ajuste osmótico y con alteraciones en el metabolismo del azúcar que provocan una mayor acumulación de sacarosa en la raíz del mutante en condiciones de estrés.

Objetivos

II. OBJETIVOS

En el contexto del programa de mutagénesis insercional con T-DNA en tomate que se está desarrollando de manera coordinada entre tres grupos de investigación (IBMCP, UAL y CEBAS), se ha utilizado la colección generada a partir de la variedad comercial de tomate *S. lycopersicum* cv Moneymaker con el objetivo de identificar mutantes afectados en el desarrollo y/o tolerancia a la salinidad y estrés hídrico. Este trabajo se ha centrado en la identificación y caracterización fenotípica, fisiológica, genética y molecular de dos mutantes; uno denominado *afs1* (*abnormal fruit set 1*) por presentar alteraciones en el desarrollo reproductivo y donde la mutación responsable no está etiquetada por el T-DNA, y otro que la mutación responsable sí está etiquetada por el T-DNA y tiene anulada la expresión del gen *SIWAK1* (*Wall-Associated Kinase 1*), denominado *wak1*, y que presenta alteraciones en la respuesta a la salinidad y sequía. Los objetivos específicos son:

1. Mutante *afs1* afectado en el desarrollo

- 1.1. Estudiar los aspectos fenotípicos más relevantes centrándonos en el desarrollo reproductivo debido a sus rasgos de tasa de cuaje y partenocarpia
- 1.2. Estudiar la formación y desarrollo del fruto desde su cuaje a nivel morfológico y las causas de su partenocarpia
- 1.3. Evaluar las características de la producción del mutante en condiciones naturales, y la calidad de fruto y capacidad de conservación postcosecha

2. Mutante *wak1* alterado en la respuesta a estrés abiótico

- 2.1. Analizar el patrón de expresión del gen *SIWAK1* y de los genes flanqueantes (*SIWAK2* y *SIWAK3*) en el cv. Moneymaker y en el mutante.
- 2.2. Identificar los cambios de desarrollo inducidos por la anulación del gen *SIWAK1* en condiciones sin y con estrés.
- 2.3. Determinar la respuesta fisiológica del mutante al estrés iónico inducido por la salinidad y al estrés osmótico inducido por salinidad y sequía.
- 2.4. Estudiar el papel del gen *SIWAK1* en el metabolismo de la sacarosa en raíz

Material y métodos

III. Material y métodos

1. Material vegetal

Este trabajo de investigación se ha realizado con tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Moneymaker. Con este cultivar se ha generado una colección de mutantes insercionales de T-DNA con trampa de intensificadores. Esta variedad de tomate se seleccionó para el programa de mutagénesis insercional debido a su alta eficiencia de transformación. Es una variedad comercial de tomate desarrollada para su cultivo en invernadero que se caracteriza por tratarse de plantas con hábito de crecimiento indeterminado y frutos homogéneos de calibre mediano.

2. Construcción usada para la transformación

Las líneas han sido generadas usando una trampa de intensificadores mediante la construcción proporcionada por el Dr. Thomas Jack del departamento de biología del Dartmouth College (Hannover, New Hampshire, Estados Unidos) que consta del vector *pD991* conteniendo la cassette de T-DNA (Campisi et al., 1999). Entre las características más importantes de esta cassette se encuentran (i) un promotor mínimo -60CaMV que es una versión truncada del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV), que contiene una caja TATA pero que por sí mismo no es capaz de inducir la transcripción si no es con el auxilio de elementos reguladores del genoma del tomate transformado, y que se localiza aguas arriba de (ii) la secuencia codificante del gen delator *uidA* (gen que codifica para la β -D-glucuronidasa, GUS), a continuación se encuentra (iii) el terminador correspondientes de la 3'-nopaline sintasa (3'NOS), y finalmente (iv) la secuencia codificante de un gen de selección de transformantes que es *nptII* (*Neomicina fosfotransferasa II*) que confiere resistencia antibióticos aminoglicósidos, entre ellos kanamicina (kan), y cuya expresión está bajo el control de su propio promotor y terminador de manopina sintasa (5'-pmas y 3'-pmas) presentes en la construcción (**figura 10**) (Campisi et al., 1999).

El proceso de transformación genética de las plantas de tomate con dicha construcción, la regeneración de los transformantes y la comprobación de la ploidía

mediante citometría de flujo para generar la colección de mutantes se llevaron a cabo por el grupo de investigación de Biotecnología y Cultivo *in vitro* dirigido por el Prof. Vicente Moreno de IBMCP (UPV-CSIC), siguiendo los protocolos descritos en Atarés et al. (2011).

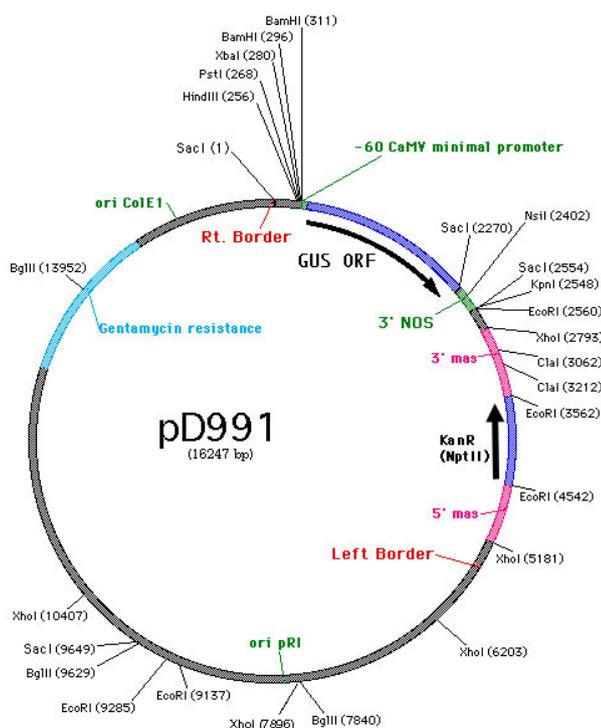


Figura 10. Esquema de la construcción genética utilizada en la transformación de tomate para generar la colección de mutantes insercionales

3. Multiplicación y mantenimiento *in vitro* de líneas T-DNA de tomate

Tras la selección de explantes diploides transformados se obtuvieron las plantas TG1 (de Transformant Generation 1 o generación transformante). De cada planta TG1 se obtuvieron 9 réplicas clonales mediante tres rondas de clonación: 2 copias se mantienen *in vitro* dentro de la colección; 2 copias se aclimataron para obtener semillas TG2, con dos plantas más se analizaron los elementos de regulación de genes implicados en procesos de desarrollo. Las 3 plantas restantes se utilizaron para el análisis de la respuesta a estrés abiótico. En la **figura 11** se muestra un esquema del proceso de generación y evaluación de la colección de líneas T-DNA.

4. Test de selección por tolerancia a kanamicina

El gen *nptII* que contiene la construcción genética de transformación se usa como marcador de selección pues la kanamicina resulta tóxica para las células vegetales; solamente las plantas transformadas con la construcción que contiene el T-DNA serán capaces de desarrollarse en un medio de cultivo con kan. Este test permite seleccionar las plantas que contienen integrado en su genoma el cassette de T-DNA y así poder realizar análisis de segregación de presencia ausencia de inserto T-DNA en una población dada.

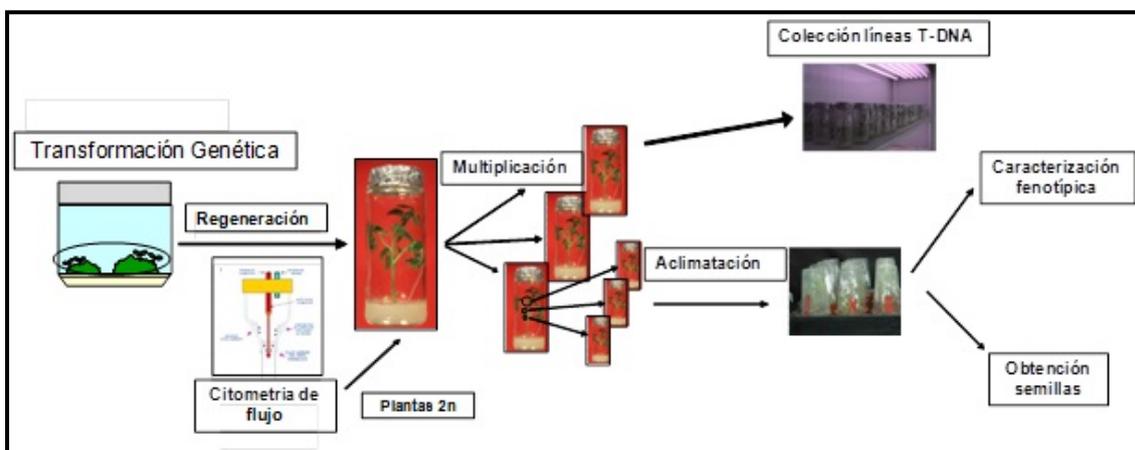


Figura 11. Esquema del proceso de transformación genética, regeneración y selección de transformantes y obtención de plantas TG1 para aclimatar y obtener semillas y evaluar el fenotipo.

4.1. Test de kanamicina con semillas

Se realiza con un mínimo de 100 semillas procedentes de cada planta a evaluar, que se disponen en medio básico de germinación (**tabla 7**) con $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kan. La lectura final se hace 21 días tras la germinación de las semillas y se hace el recuento del número de semillas germinadas así como del número de plántulas resistentes, cuyo fenotipo es el correspondiente al fenotipo de una plántula WT crecida en medio de sin agentes de selección (**figura 12A**). Las plántulas sensibles no desarrollan raíces secundarias, acumulan antocianos en el tallo (color violáceo) y no desarrollan hojas verdaderas.

4.2. Test de Kanamicina por vaporización directa sobre foliolo

Se realiza *in vivo*, vaporizando directamente una solución de agua con kanamicina ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) sobre hojas jóvenes. Se marca la hoja seleccionada y se pulveriza sobre ella la anterior solución durante 3 días seguidos. Como control se pulveriza la hoja adyacente (previamente marcada) de la misma forma pero solo con agua. La lectura se puede hacer tras 14 días aproximadamente y se basa en la aparición de una marcada despigmentación foliar (clorosis) en las hojas de plantas que no contienen el gen *nptII* funcional mientras que las plantas que sí lo contienen no presentan alteraciones en la pigmentación foliar (**figura 12B y C**). Es un método poco invasivo, rápido y fácil de aplicar que permite el análisis de un gran número de plantas ya sea en condiciones de cámara o de invernadero (Weide et al., 1989).

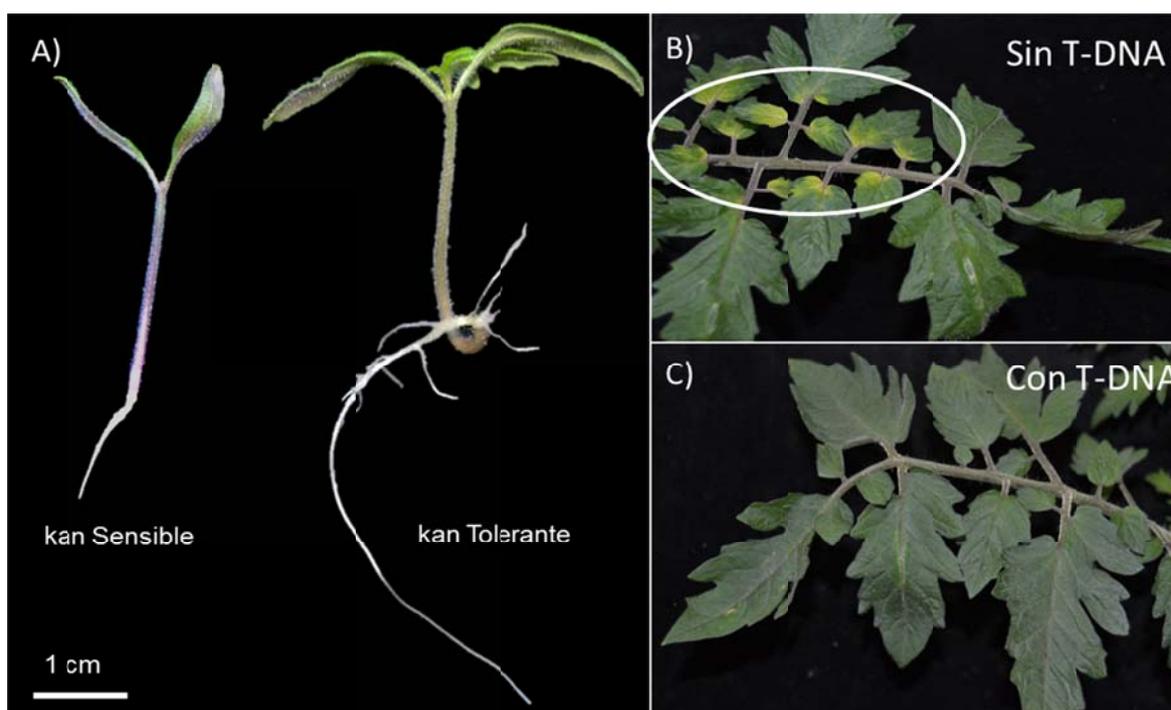


Figura 12. Test de kanamicina. Fenotipos de las plántulas correspondientes a los test de kanamicina llevados a cabo en semillas (A), Hoja de una línea sin T-DNA tratada con kan (B) y hoja de una línea con inserto de T-DNA tratada con kan (C).

5. Análisis histoquímico de la expresión del gen delator *uidA*

La expresión del gen delator (*uidA*) es una herramienta muy útil que nos permite conocer el patrón de expresión del gen etiquetado. El hecho de que la expresión de este gen no sea constitutiva si no que dependa de los elementos reguladores del genoma de la planta próximos al inserto T-DNA permite estudiar el patrón de expresión espacial y temporal y en función de las condiciones de cultivo del gen etiquetado por dicho inserto (el gen mutado por el T-DNA).

El análisis de la expresión espacio-temporal de gen delator *uidA* se basa en la determinación de la actividad GUS mediante histoquímica, y se siguió el siguiente protocolo (Atarés et al., 2011): cada una de las muestras del tejido de la planta a analizar se incubaba durante 24 horas en la disolución de tinción (ver composición en **tabla 3**) que contiene el sustrato cromogénico ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucurónico (X-Gluc) (Campisi et al., 1999). Posteriormente el tejido se decolora con un primer lavado (24h) en etanol al 70%, seguido de sucesivos lavados con etanol puro hasta que la clorofila se haya degradado completamente. Cuando todo el tejido está totalmente despigmentado se almacena en una solución de glicerol al 20%. Se examina la tinción GUS de la muestra y se fotografía con un estereomicroscopio SMZ1500 (Nikon, Japón) acoplado a una cámara fotográfica Reflex Nikon D70 (**figura 13**).

Tabla 3. Compuestos y concentraciones de la solución de tinción para el ensayo GUS

GUS	
Reactivo X-Gluc	Concentración
Tampón Fosfato pH 7	50 mM
EDTA	10 mM
Triton-X 100	0,5 mg·mL ⁻¹
X-Gluc	1 mg·mL ⁻¹
FeCN	0,5 mM
Metanol	20%



Figura 13. Tinción GUS positiva en diferentes tejidos

6. Métodos y técnicas utilizadas en el cultivo *in vitro*

6.1. Medios de Cultivo utilizados

Todos los medios de cultivos *in vitro* utilizados en esta tesis contienen una base común de solución mineral comercial (Duchefa biochemie).

6.2. Cultivo *in vitro* de semillas

La germinación *in vitro* se realizó de la siguiente manera:

Esterilización:

-30 minutos en hipoclorito sódico al 50% + 3 gotas de Triton X-100

-3 lavados con agua destilada estéril de 5, 10 y 15 min.

Una vez esterilizadas, estas semillas se sembraron en el medio deseado.

El medio de germinación de semillas descrito se usa como un medio básico (tabla 4). Distintas modificaciones del medio básico se han aplicado para la evaluación fenotípica de las plantas mutantes.

Tabla 4. Medio básico utilizado para la germinación de semillas.

Medio Germinación	g·L⁻¹
Solución mineral MS	4,3
Sacarosa	10,0
Agar	8,0

-Medio enriquecido con sacarosa

Medio básico de germinación + distintas concentraciones de sacarosa (1% y 2%)

10 y 20 g·L⁻¹

-Medio para selección con kanamicina

Para los ensayos de selección de plantas por tolerancia a kan se añaden al medio básico de germinación 100 mg·L⁻¹ kan.

6.3. Condiciones de la cámara de cultivo *in vitro*

Las experiencias se llevaron a cabo en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h de luz de intensidad $76 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (PAR), y 8 h de oscuridad, con 25°C de temperatura durante todo el ciclo día/noche. Para la iluminación se emplearon tubos fluorescentes GroLux de 58 W (Sylvania).

6.4. Aclimatación

Es una etapa intermedia entre el cultivo *in vitro* e *in vivo* que tiene por objetivo mantener la alta humedad relativa en el ambiente que rodea a las plantas y es fundamental para que las plantas procedentes de cultivo *in vitro* (donde la humedad relativa es muy próxima a 100% y la iluminación baja) se adapten con éxito a las condiciones *in vivo* (humedad ambiental variable entre el 30% y 70% y una iluminación con una intensidad de radiación PAR mucho más elevada). Tras 20 días de cultivo en medio de enraizamiento (**tabla 5**) se realiza la aclimatación y para ello se rescatan las plantas del agar, limpiando las raíces suavemente en agua destilada trasplantándose a macetas con una mezcla de turba/perlita (8:3) previamente esterilizada. Para que estas plantas se puedan adaptar a las condiciones *in vivo* se mantienen en un ambiente con alta humedad (introduciendo las plantas en un mini-invernadero o tapando las plantas con un vaso de plástico). Paulatinamente se va disminuyendo la humedad relativa abriendo el mini-invernadero o retirando el vaso primero durante cortos periodos de tiempo que van aumentando hasta que las plantas quedan expuestas a las condiciones ambientales típicas de la cámara. Este proceso tiene una duración aproximada de 6 días.

7. Obtención de progenies TG2 e identificación de homocigotos en TG3

Como ya hemos indicado, 2 réplicas clonales TG1 de cada línea T-DNA se cultivaron en invernadero con el objetivo de obtener las semillas que darán lugar a la población segregante TG2 de cada línea por autopolinización. De la misma manera se obtienen progenies TG3 donde se identifican los individuos homocigotos y

III. Material y métodos

acigotos para el inserto de T-DNA con cuyas progenies se llevará a cabo la caracterización de los mutantes identificados y seleccionados por el interés de su fenotipo. La identificación de las líneas homocigotas se realiza mediante test de kanamicina, análisis de la presencia del gen delator *uidA* y del gen marcador *nptII* y *uidA* por PCR (Polimerase Chain Reaction o Reacción de la Polimerasa en Cadena) (Saiki et al., 1985) de DNA genómico (gDNA).

8. Métodos y técnicas de cultivo *in vivo*

8.1. Cultivo de plantas en cámara en condiciones controladas (CCC)

Las semillas utilizadas se germinaron en semilleros de plástico de 60x40x12 cm y 96 pocillos. La germinación se realizó en una mezcla de turba negra y perlita en proporción 8:3 y con unas condiciones de temperatura y humedad relativa de 28°C y 80% respectivamente. Las semillas se mantuvieron en oscuridad durante las primeras 48-72 horas después de la siembra para estimular la germinación. Las condiciones de cultivo utilizadas para los experimentos son las siguientes: humedad relativa entre un 50% y 80% y temperatura en un rango entre 18°C (noche) y 25°C (día) con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (**tabla 5**). La intensidad de luz y la temperatura durante el ciclo se programó para variarla con el fin de reproducir en lo posible el ciclo natural.

Tabla 5. Condiciones de cultivo en cámara de cultivo CCC

Tiempo (h)	2	2	8	2	2	8
Intensidad de luz ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$)	81	162	245	162	81	-
Temperatura (°C)	20	23	26	23	20	18

Estas variables de cultivo están controladas y monitorizadas de forma automatizada. La disolución nutritiva utilizada tanto para el riego de los semilleros como para el posterior cultivo hidropónico fue Hoagland diluida al 50% ($\frac{1}{2}$) (Hoagland and Arnon, 1950). La composición de esta disolución se muestra en la **tabla 6**.

Las plantas se mantienen en los semilleros hasta que desarrollaron 2-3 hojas verdaderas, momento en el que se transfieren al medio de cultivo definitivo donde se desarrollaría la experiencia en cuestión.

8.2. Cultivo en sustrato

Las plántulas con estado de desarrollo de dos-tres hojas verdaderas se trasplantan a macetas de 15 cm de diámetro usando como sustrato la mezcla de turba y perlita antes descrita para la germinación de las semillas. El sustrato se humedece completamente antes del trasplante y una vez realizado, y con el fin de amortiguar el estrés sufrido, así como permitir el desarrollo de la raíz, se dejan aclimatar durante una semana antes de iniciar cualquier tratamiento y ensayo. La frecuencia de riego variará acorde al estado de desarrollo de las plantas y se realiza a demanda para mantener las condiciones óptimas de crecimiento homogéneo para la población de estudio, evitando tanto la desecación como el exceso de solución. Se utiliza la solución Hoagland ½ que a su vez sirve de base para para formar las soluciones de los tratamientos salinos.

Tabla 6. Composición de las soluciones nutritivas que componen la disolución Hoagland utilizada para el cultivo de plantas en CCC

Solución A	g·L⁻¹
NH ₄ NO ₃	8,0
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	82,6
KNO ₃	35,7
Solución B	
KNO ₃	5,0
KH ₂ PO ₄	27,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24,6
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,053
H ₃ BO ₃	0,140
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,015
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,008
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,060
Fe	
Fe-EDDHA 6%	1,87

8.3. Sistema dos a dos en sustrato para ensayos de estrés hídrico

La caracterización fenotípica de la respuesta al estrés hídrico se realizó en CCC y la aplicación del estrés hídrico se llevó a cabo mediante ciclos sucesivos de deshidratación y rehidratación. El sistema utilizado para evaluar la respuesta al estrés hídrico enfrenta en la misma maceta y bajo las mismas condiciones de humedad y transpiración tanto a la línea control (planta WT) y la línea a evaluar (mutante) (**figura 10**). La mezcla turba/perlita debe estar completamente humedecida y se distribuye la misma cantidad de sustrato por maceta (para ello se pesa maceta a maceta con la mezcla tierra/perlita saturada de agua) con el objetivo de evaluar ambas líneas por parejas (WT vs mutante) bajo las mismas condiciones.



Figura 14. Sistema dos a dos para la evaluación de la respuesta a estrés hídrico en plantas de tomate (WT vs mutante)

Se aplicaron 4 ciclos donde el periodo de privación de riego fue variable dependiendo del estado de deshidratación de las plantas, después del cual se reinició el riego durante dos días antes de comenzar el siguiente ciclo de deshidratación. El seguimiento y evaluación de las plantas se llevó a cabo tanto en el proceso de deshidratación como en el de rehidratación.

8.4. Cultivo en sistema hidropónico

El sistema de cultivo hidropónico (**figura 15**) es un sistema idóneo para la evaluación de la respuestas a corto y medio plazo de tratamientos salinos bajo condiciones controladas de cultivo, que permite además examinar el sistema radicular de las plantas y muestrearlo sin interferencias de sustrato sólido.



Figura 15. Aspecto general de las plantas de tomate en cultivo hidropónico.

El sistema dispone de una serie de bombas electrónicas que permiten el llenado de las cubetas que son 3 depósitos con capacidad de almacenamiento de 100 L cada una, donde se preparan las soluciones de cultivo. Para garantizar unas condiciones óptimas de cultivo se realizan controles periódicos de las condiciones del medio hidropónico mediante un seguimiento del pH, la conductividad eléctrica (CE) y el análisis del contenido iones, procediéndose a la renovación de las disoluciones con una frecuencia mínima de una vez por semana. Esta disolución se airea mediante un burbujeo continuo y constante suministrado por un compresor Puska N-150-50, con un caudal de $115 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, presión máxima $10 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ y capacidad de 50 litros. Las condiciones de temperatura y humedad son las mismas que las indicadas para el cultivo en CCC. Las soluciones normalmente usadas son Hoagland $\frac{1}{2}$ considerada como control (sin sal), 100mM de NaCl (medio de adaptación al shock salino) y 200mM de NaCl (medio final de ensayo de estrés salino). Tras cada experiencia todo el sistema de cultivo hidropónico se vacía, se limpia con agua a presión y se seca.

El sistema en sí consta de grandes cubetas (hasta 8) de fibra de vidrio con capacidad para 50 litros de disolución nutritiva. Las cubetas disponen de unas tapaderas perforadas donde se sitúan las plantas (hasta un máximo de 40 plantas por cubeta) encajadas en unos soportes de plástico con algodón hidrófobo en su interior. El sistema permite guiar las plantas a unos soportes situados en su parte superior. Las plantas se distribuyen homogéneamente por la cubeta y el número de sujetos por experiencia se fija en función del estado de desarrollo en el que se desea realizar la experiencia. Antes del inicio de cada experiencia se mantienen las

plantas bajo condiciones control al menos durante una semana para permitir el correcto desarrollo del sistema radicular y la aclimatación de las plantas a dicho medio. La aplicación del tratamiento salino se produce de forma gradual y durante los periodos de baja iluminación, cuando las plantas presentan una menor tasa de transpiración y así reducir en lo posible el choque osmótico.

8.5. Cultivo en condiciones de invernadero

Para la evaluación de los efectos de diferentes tratamientos de estrés (salino e hídrico) a largo plazo y en particular sobre la producción de frutos (en condiciones similares a las comerciales) el cultivo se llevó a cabo en invernadero. El invernadero utilizado se encuentra situado en la finca experimental del CEBAS-CSIC en la comarca de La Matanza del término municipal de Santomera (Murcia). Es un invernadero de una superficie de 1.000 m² completamente cerrado y dotado de ventiladores y sistema de refrigeración del aire por evaporación, para la regulación de temperatura (sistema de "cooling"). Este sistema se activa cuando la temperatura supera los 24°C. El sustrato utilizado en los contenedores de poliestireno donde se cultivan las plantas es fibra de coco en contenedores de poliestireno (**figura 16A**) con un volumen de 32 litros y espacio para un máximo de 3 plantas/contenedor. El riego se suministra automáticamente por goteo, usándose goteros de un caudal de 3 L-hora⁻¹. El marco de plantación fue de 1x2 m² con un gotero por cada planta. Se eliminaron periódicamente las yemas laterales de las plantas, que se entutoraron para mantener su crecimiento.

La fertilización se ajustó para el cultivo del tomate (Nuez, 1995) a fin de conseguir unos niveles óptimos de nutrientes. Se dispone de tres depósitos de 2.000 litros cada uno para la preparación, almacenamiento y administración de las soluciones de cultivo que son debidamente controladas y normalizadas según las condiciones deseadas (**figura 16B**). Un cuarto depósito contiene una solución ácida destinada a regular el pH de la solución de riego, mientras que en un quinto depósito se prepara una disolución concentrada de NaCl usada para los ensayos de

estrés salino, aplicándose a una concentración final de 100mM de NaCl en la solución de riego.



Figura 16. Aspecto general del sistema de riego por depósitos y del invernadero donde se han realizado los experimentos a largo plazo de estrés salino e hídrico de tomate.

La solución final de fertirrigación (ver composición en **tabla 7**) se preparó en otros cuatro depósitos a partir de las disoluciones madres de los abonos y añadiendo la solución salina concentrada del depósito de NaCl mediante un sistema de mezcla por inyección automática, que permite utilizar hasta cuatro tratamientos salinos distintos. La regulación de la inyección se realiza mediante medidas de CE. La CE inicial para el agua de riego está alrededor de $1 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-2}$ para la disolución de riego en control (sin sal) mientras que para el tratamiento salino de 100 mM de NaCl es de $12 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-2}$. Periódicamente se realizaron análisis del contenido de iones tanto del agua, de la disolución de riego y del lixiviado producido por el riego para comprobar que la composición de la solución de fertirrigación son las deseadas. El control de riego es realizado por un sistema automatizado y un programa y las condiciones de riego variaron según el estado de desarrollo de la planta y las condiciones ambientales.

El traslado a invernadero se realiza con plantas en un estado de desarrollo de 5-6 hojas verdaderas, donde se aclimatan durante una semana a las condiciones del invernadero antes de realizar el trasplante. Antes del inicio de los ensayos de estrés salino las plantas trasplantadas se aclimatan durante 7-15 días. La concentración salina utilizada para los experimentos en invernadero es de 100 mM de NaCl.

Tabla 7. Composición de la solución nutritiva usada para la fertirrigación en invernadero

Macronutrientes (mM)					
N(NO ₃ ⁻)	N(NH ₄ ⁺)	P(PO ₄ ³⁻)	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²
12,0	0,5	1,5	7,0	4,0	2,0
Micronutrientes (µM)					
Fe ⁺³	Cu ⁺²	Mn ⁺²	Zn ⁺²	B ⁺³	
29-59	2-5	10-20	3-7	20-45	

9. Evaluación de las características fenotípicas

El material vegetal utilizado fue tanto plantas TG1 como TG2. Se utilizaron como control testigos plantas WT no transformadas procedentes de semillas. También se fenotiparon plantas de la población segregante TG2 y de líneas puras para el fenotipo TG3 y descendientes. Las plantas se evaluaron fenotípicamente en condiciones estándar (sin estrés) y/o bajo condiciones de estrés (salino e hídrico) (**figura 17**). El número mínimo de plantas utilizado para la evaluación de fenotipos fue 4-6 plantas TG1 junto con WT, y 20-24 plantas TG2 junto con WT.

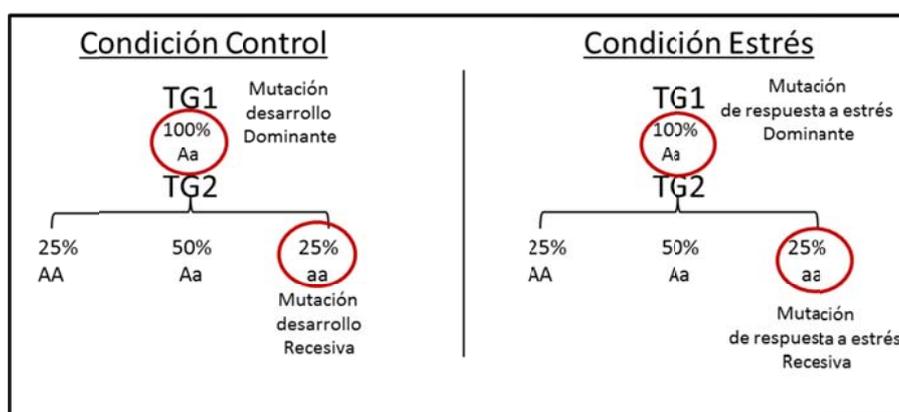


Figura 17. Patrón de segregación mendeliano esperado para líneas con mutación monogénica. Las líneas mutantes con cambios fenotípicos o fisiológicos en condiciones control son catalogadas como mutaciones de desarrollo ya que ocurren con independencia a la exposición a estrés. Las mutaciones que específicamente afectan a la respuesta a estrés (salinidad o sequía) solo aparecen durante o tras la exposición a estrés. Las mutaciones dominantes aparecen en la primera generación en el 100% de la población mientras que las recesivas solo aparecen en la segunda generación con una frecuencia del 25%. TG1, T-DNA Generation 1 o generación transformante; TG2, T-DNA Generation 2 o progenie segregante; A, Alelo Dominante; a, Alelo Recesivo.

9.1. Evaluación de caracteres de desarrollo vegetativo y reproductivo

Para evaluar caracteres de desarrollo vegetativo y reproductivo se realizaron 3 lecturas, después de la 1ª, 2ª y 4ª semana tras el trasplante de las plantas en el invernadero. En la **tabla 8** se muestran los caracteres que se evaluaron para llevar a cabo el fenotipado de líneas mutantes.

CATEGORIA	CARACTER
Desarrollo Vegetativo y estrés	Altura de la planta
	Longitud de hojas en desarrollo
	Nº de hojas desarrolladas
	Contenido de agua
	Contenido de clorofilas
Desarrollo Reproductivo	Medidas de fluorescencia
	Nº de Inflorescencias por planta
	Nº de flores por inflorescencia
	Peso total de frutos por planta
	Nº total de frutos por planta

Tabla 8. Caracteres evaluados para identificar fenotipos mutantes de desarrollo vegetativo y reproductivo, y para determinar la tasa de crecimiento comparando condiciones de control vs. estrés en las líneas mutantes ensayadas.

10. Obtención de extractos para los análisis fisiológicos

El procesamiento de las muestras obtenidas se realizaba por tres métodos diferentes: por digestión con una mezcla de ácido nítrico/perclórico, por centrifugación para la obtención de un extracto crudo y mediante liofilización.

10.1 Por digestión

Para la determinación de los distintos iones en material vegetal se realizó un proceso de digestión de las muestras mediante el siguiente protocolo: 100 mg de material seco y molido se depositó en un tubo de vidrio al que se le añadió 10 mL de una disolución de HNO₃:HClO₄ en proporción 2:1 (v/v). Los tubos se introducían en un digestor Block Digest (Selecta, España) durante al menos 6 horas. Cuando el material estaba completamente digerido se retiraron las muestras del digestor y se enrasaron los tubos a 50 mL con la disolución de digestión, se homogenizó la

mezcla y se transfirió a nuevos viales de volumen apropiado para su almacenamiento (4°C) hasta llevar a cabo su análisis el análisis.

10.2 Por centrifugación: Obtención de un extracto crudo fresco

Para la obtención del extracto fresco de material vegetal se introdujo alrededor de 8 gramos de foliolo u otro material vegetal en puntas de pipeta de 5 mL en las que se disponía previamente una pequeña cantidad de fibra de vidrio en la punta que actuaba a modo de filtro durante la centrifugación, propiciando la recolección del extracto crudo. Se toman los pesos para las puntas vacías y llenas. Seguido se congelaron en nitrógeno líquido para promover la ruptura celular y la liberación de los metabolitos intracelulares. Las puntas se centrifugaron en una centrifuga Haerus labofuge II (Haerus, Alemania) durante 15 minutos a 1.000 g y 4°C. El volumen total obtenido de extracto se anota y se recoge por duplicado en tubos de 1,5 mL y se vuelve a centrifugar a 14.000 g durante 15 minutos y 4°C en una centrifuga Sigma 2k15 (B. Braun, Alemania), recogiendo el sobrenadante y quedando en el precipitado todas las impurezas, macromoléculas y restos celulares. Este extracto se conserva a -20°C hasta su posterior análisis.

10.3 Por liofilización

El liofilizado se realizaba a partir de material vegetal fresco que se pesaba previamente y posteriormente se congelaba con nitrógeno líquido. La liofilización fue realizada mediante un liofilizador Telstar Lyoquest (Telstar Life Science Solutions, España) sobre este material congelado. La duración del proceso era de 5 días, hasta conseguir retirar toda el agua de la muestra. Después de la liofilización el material se pesaba para calcular el porcentaje de pérdida de agua. Posteriormente para conseguir una muestra homogénea ésta era triturada mediante un molino mezclador MM 400 (RETSCH, Alemania) hasta conseguir la muestra en polvo completamente homogéneo.

11. Determinación de parámetros fisiológicos

11.1 Incremento en longitud

Se estimó el crecimiento vegetativo de las plantas en base al incremento en longitud en el tiempo tanto para las plántulas como plantas adultas, así como para raíces, hojas y entrenudos:

$$\text{Incremento en longitud} = (D2 - D1) / (t2 - t1)$$

donde D1 y D2 son la longitud del tejido a evaluar en el tiempo 1 y 2, respectivamente, y donde t1 y t2 corresponden al tiempo en el que se llevó a cabo el primer y último muestreo respectivamente.

Durante el transcurso de los distintos experimentos, el crecimiento de las plantas también se caracterizó tomando medidas de peso fresco para la parte aérea y la raíz.

11.2. Relaciones hídricas

11.2.1. Contenido de agua

El contenido de agua se obtuvo por diferencia de peso fresco y peso seco de la muestra mediante la fórmula:

$$\text{Contenido agua} = (\text{peso fresco} - \text{peso seco}) / \text{peso seco}$$

Para ello las muestras se pesan al ser recogidas (peso fresco) y se mantienen un mínimo de 48 horas en una estufa a 70°C hasta conseguir un peso constante (peso seco). El contenido de agua se expresa en mL H₂O·g Peso Seco.

11.2.2. Potencial Osmótico

El potencial osmótico se determinó por el método crioscópico de depresión del punto de congelación, utilizando un osmómetro Osmometer Automatic (Roebeling,

Alemania) a partir de extracto crudo fresco (muestras obtenidas por centrifugación). El osmómetro crioscópico determina el potencial osmótico de una solución mediante la medición de su punto de congelación. Las soluciones tienen propiedades coligativas que colectivamente dependen del número de partículas disueltas y no de la naturaleza del soluto. Una de las propiedades coligativas de las soluciones es la disminución en el punto de congelación a medida que la concentración de soluto aumenta. Así, una solución que contiene 1 mol de solutos por kilogramo de agua tiene un punto de congelación de $-1,86^{\circ}\text{C}$, en comparación con el agua pura, cuyo punto de congelación es de 0°C (Taiz and Zeiger, 2007).

Las medidas se realizaron a partir de extractos crudos individuales de folíolos (pool de folíolos de la misma hoja) y extractos de raíz (formando un pool) obtenidos por centrifugación y previamente congelados en nitrógeno líquido. Se realizan 2 medidas por individuo. El equipo es calibrado en dos puntos: i) agua destilada (que marca el valor 0) y ii) NaCl de 300 mOsmol. Las medidas se realizan en 100 μL de extracto. La transformación desde unidades mOsmol ($\text{mmol de soluto osmóticamente activo} \cdot \text{Kg}^{-1}$) que proporciona el equipo a MPa se realiza por la equivalencia tal y como se describe en las especificaciones del fabricante:

$$\text{MPa} = ((-2 \times \text{mmol} \cdot \text{Kg}^{-1}) / 1000) \times \text{factor de dilución}$$

11.2.3. Potencial hídrico

El potencial hídrico de las plantas se estimó mediante una cámara de presión de Scholander (Soil Moisture modelo 3000, EE.UU). El método está basado en la determinación de la salida de la savia del xilema de una hoja o tallo cuando la presión aplicada es suficiente para forzar la salida del agua de las células vasculares. En esta situación la presión será igual al potencial hídrico de las hojas (Scholander et al., 1964).

En esta técnica, se escinde el órgano a medir (generalmente se usa para hojas o pequeños brotes) y se sella en una cámara de presión. Antes de la escisión, la columna de agua en el xilema está bajo tensión. Cuando la columna de agua se rompe por la escisión del órgano (es decir, su tensión se alivia permitiendo que su

presión hidrostática, que es negativa, se eleve a cero), el agua sale rápidamente del xilema hacia las células vivas que rodean el xilema, por ósmosis. La superficie de corte, en consecuencia se torna más opaca y seca. Para realizar una medición, el investigador presuriza la cámara con gas comprimido hasta que la distribución de agua entre las células vivas y los conductos del xilema retorna a su estado inicial, antes de la escisión. La presión necesaria para llevar el agua de nuevo a su distribución inicial se llama la presión de equilibrio y se detecta fácilmente por el cambio en el aspecto de la superficie de corte, que deviene húmedo y brillante cuando se alcanza esta presión (Taiz and Zeiger, 2007).

Para el cálculo del potencial hídrico de cada planta se realizaban tres medidas en folíolos de la tercera o cuarta hojas completamente desarrollada. Las medidas siempre se realizan en el mismo periodo de tiempo, tres horas a partir del inicio de la fase luminosa. Los resultados obtenidos vienen expresados bares y se transforman a MPa (1 bar=0,1MPa)

11.2.4. Potencial de turgor o Turgencia

Se calculó en base a la modificación de la ecuación que rige el potencial hídrico para el transporte del agua a nivel celular (Taiz and Zeiger, 2007). Se omite el componente gravitacional debido a que es despreciable en comparación con el potencial osmótico y el potencial hídrico.

Así, la ecuación se simplifica como:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_t \text{ (expresado en MPa)}$$

11.3 Estimación de la integridad de las membranas celulares mediante la determinación de la salida, pérdida o fuga de electrolitos

Los daños en las membranas celulares producidos por la exposición a estrés se pueden estimar utilizando como parámetro la pérdida o fuga de electrolitos. Esta pérdida se produce por la desintegración de la estructura de la membrana

plasmática y en consecuencia del grado de semipermeabilidad controlada debido a diversas condiciones de estrés, pero marcadamente en aquellas donde ocurre deshidratación (Bajji et al., 2002).

El protocolo es como sigue: en primer lugar se preparan discos del material vegetal (foliolo o bien pericarpo de fruto) que se lava con agua destilada para eliminar solutos liberados por el corte del tejido y se colocan en tubos Falcon, de 50 mL con 40 ml de Manitol (0,4M) para el caso de discos de pericarpo de fruto, y de 15 mL con 5 mL de agua destilada para el caso de discos de foliolo. Se incuban los tubos a temperatura ambiente en agitador (a 100 ciclos/min) durante 3 horas y se toma una primera lectura de CE (C1). A continuación los tubos se congelan como mínimo durante una noche y después se someten a autoclavado. Tras enfriar éstos se toma la segunda lectura de CE (C2). La pérdida de electrolitos se expresa en términos porcentuales (%) como $(C1/C2) \cdot 100$. Como en determinación de este parámetro influye grandemente la edad de la planta y la posición de la hoja (Bandurska and Gniazdowska-Skoczek, 1995, Adam et al., 2000) todos los experimentos se llevaron a cabo en el mismo estado de plántula, siempre utilizando los foliolos de la hoja más superior completamente expandida y de similares dimensiones.

11.4. Tasa fotosintética (P_n) o tasa de asimilación de CO_2 (A), tasa de transpiración (E) y conductancia estomática (g_s)

Para la determinación de la tasa fotosintética (P_n) o tasa de asimilación de CO_2 (A), tasa de transpiración (E) y conductancia estomática (g_s) se utilizó un analizador de intercambio gaseoso por IR portátil (CIRAS-2, PP systems, Amesbury-MA, EE.UU.) siguiendo las especificaciones e instrucciones del fabricante (**figura 18**). Las medidas no destructivas se realizaron siempre durante la misma franja horaria para evitar los efectos del ciclo circadiano sobre estas medidas, y con plantas en estados de desarrollo idénticos y en foliolos de similares tamaños pertenecientes a hojas homólogas, para evitar los efectos del desarrollo.

Las condiciones del equipo fueron las siguientes: la superficie foliar de medida fue de 1,7 m², el nivel de CO₂ de referencia fue 480 ppm, la temperatura de la hoja en la cámara variaba entre 25,7 a 26,8°C, la velocidad del flujo de gas de la hoja en la cámara de medición fue de 195 mL·min⁻¹, se trabajó a presión ambiental (1.010 mb) y la densidad del flujo de fotones (energía de la radiación fotosintéticamente activa o PAR) fue de 500 μmol·m⁻²·s⁻¹. E y g_s se expresaron como mmol·m⁻²·s⁻¹ y A/P_n en μmol·m⁻²·s⁻¹.



Figura 18. Imágenes del equipo CIRAS-2 de PP systems.

11.5. Medida de la tasa de transpiración pasiva

Para analizar la tasa de transpiración pasiva se midió la capacidad de pérdida de agua de forma pasiva a través de los folíolos. Para ello, se procedió a escindir 10 folíolos de la tercera hoja pertenecientes a tres plantas por genotipo y condición experimental (control vs estrés), y se monitorizó la pérdida de peso del folíolo durante 24 horas. La pérdida de peso se expresa en porcentaje respecto al peso inicial del folíolo.

11.6. Contenido de clorofila

El contenido en clorofilas se determina con un medidor SPAD-502 (Minolta, Kyoto, Japón) que permite calcular semi-cuantitativamente el contenido de clorofila mediante la medida de la fluorescencia de la clorofila a dos longitudes de onda distintas; una a la que absorbe la clorofila (650 nm) y otra a la que no absorbe (940

nm) pero que permite compensar el grosor de la hoja (Ling et al., 2011). El aparato proporciona unas unidades relativas denominadas SPAD (Soil Plant Analysis Development units) descrito por Hoel y Solhaut (1998), que se correlacionan con el contenido en clorofilas de la planta. Se realizaron 3 medidas de la misma hoja, analizándose un mínimo de 6 plantas por genotipo y tratamiento.

11.7. Determinación de Cationes

La medida de los contenidos en cationes Na⁺ y K⁺ se realizó a partir de extracto vegetal crudo o bien material digerido. Las medidas se realizaron en la plataforma de Ionómica del CEBAS-CSIC mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (OES-ICP, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, EE.UU.).

12. Evaluación del desarrollo reproductivo y sus características

12.1. Evaluación de la tasa de cuajado

Para evaluar la tasa de cuajado asociado al fenotipo de interés se realizaron 3 medidas de producción en invernadero, en diferentes campañas, donde se compararon plantas WT frente a plantas mutantes. Para ello se evaluaron las variables como el número de inflorescencias, el número de órganos florales por inflorescencia y el número frutos cuajados por inflorescencia, planta a planta.

12.2. Evaluación de la producción

Se llevó a cabo en plantas cultivadas en condiciones de invernadero. Para la evaluación de la producción y rendimiento de las líneas de estudio se recolectó la producción total en al menos dos campañas de invernadero independientes. El seguimiento de la campaña se centró en el recuento del número de frutos, el peso de los mismos en cada muestreo.

12.3. Evaluación de la partenocarpia

Este seguimiento se llevó a cabo en plantas cultivadas en condiciones de invernadero y se realizó con frutos maduros. Los frutos se seccionaron transversalmente y se extrajo el mucilago junto con las semillas. Esta mezcla de mucilago y semilla fue lavada y filtrada con abundante agua. Las semillas recolectadas se sumergieron en HCl al 5% durante 2h con el fin de digerir restos de mucilago adheridos y se dejaron secar entre láminas de papel de filtro durante dos días. Para estimar el número de semillas totales, las semillas se pesaron para calcular su número, se anotaron y por último se almacenaron en un lugar seco, con temperatura suave y protegido de la luz.

12.4. Tiempo de floración

Este seguimiento se realizó en plantas cultivadas en condiciones de invernadero donde se seleccionaron flores en el mismo estadio de desarrollo, estadio de botón floral (4 días antes de antesis DAA, **figura 36.2**). Se etiquetaron un total 15 flores recolectadas de 5 individuos/línea y los resultados se contrastaron en dos experiencias independientes y se realizó un seguimiento exhaustivo del desarrollo floral para determinar la existencia de posibles anomalías en la sincronización del tiempo de floración o el momento exacto de la aparición de la anomalía en una línea mutante.

12.5. Densidad y viabilidad del polen

Se recolectó polen de 25 flores/genotipo en el estadio de antesis (**figura 36.5**) por réplica (se realizaron en total 3 réplicas) y se hicieron 10 recuentos en campos ópticos por microscopía seleccionados al azar para cuantificar la cantidad media de polen por genotipo. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Leica LMR en campo claro (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Los análisis morfométricos se realizaron usando el sistema de análisis Qwin de Leica. Para realizar el ensayo de viabilidad de polen se siguió el protocolo descrito por (Li et al., 2004).

12.6. Evaluación del efecto sobre el cuaje de fruto de la emasculación y la polinización manual

La evaluación se realizó en plantas cultivadas en condiciones de invernadero y se llevó a cabo por medio de emasculación, autopolinización y polinización cruzada (retrocruce con WT) (**tabla 9**). El primero es paso necesario para los otros dos.

Manipulación	Polen (♂) x Ovario(♀)
Autofecundación	WT x WT
Autofecundación	Mut x Mut
Polinización cruzada	WT x Mut
Polinización cruzada	Mut x WT
Emasculación	Mut
Emasculación	WT

Tabla 9. Cruces y objetivos llevados a cabo durante la evaluación del efecto ocasionado por procesos de polinización manual dirigida. WT, línea Wilde type; Mut, línea mutante

La polinización cruzada entre mutante y WT se llevó a cabo aplicando polen de la flor donadora (obtenido en el estadio de desarrollo en el que las anteras están dehiscenentes, es decir, en el estadio de antesis, (**figura 36.5**) sobre el estigma del carpelo de la flor receptora, previamente emasculada, es decir, donde se han extirpado manualmente los órganos masculinos, y en un estadio de desarrollo de pre-antesis (**figura 36.3**) cuando aún las anteras no han madurado. Para ello se recolectaron flores en antesis del parental donador. Mediante la aplicación de golpes repetidos sobre una placa de Petri se recolectó el polen. Posteriormente, con la flor receptora debidamente emasculada se polinizó manualmente con el polen recolectado depositado sobre el estigma. La autopolinización se lleva a cabo de la misma manera pero polinizando con polen del mismo genotipo que el pistilo donde se va a depositar.

12.7. Aplicación hormonas vegetales

La aplicación de ácido giberélico (GA₃) y ácido indol-3-acético (IAA) (Duchefa, Haarlem, Países Bajos) se llevó a cabo en flores emasculadas el día de antesis

(figura 36.5). La emasculación de las flores se llevó a cabo dos días antes de la antesis (figura 36.3) para evitar la autopolinización. Las hormonas se disolvían en una solución de etanol al 5% y de Tween 80 al 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y se aplicaba un volumen de 10 μ L sobre los estigmas. Como control del ensayo se trataron flores emasculadas con el mismo volumen de solvente utilizado para disolver las hormonas.

13. Técnicas de microscopía óptica

13.1 Inclusión en resina Spurr para la observación microscópica de ovarios

Se utilizaron ovarios en estado de antesis y seccionados transversalmente por la mitad para su inclusión, y secciones del pericarpo de frutos en estadio verde inmaduro.

1.-Fijación: Las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 4% en tampón fosfato sódico 0,1M a pH= 7,2 durante dos horas y media a 4°C.

2.-Lavados: Las muestras se lavaron en el mismo tampón tres veces durante 15 minutos.

3.-Postfijación: Se realizó en una solución de tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfato sódico 0,1M a pH=7,2 durante dos horas.

4.-Lavados: Se realizó en el mismo tampón dos veces durante 15 minutos y un tercero durante toda la noche.

5.-Deshidratación: Las muestras se deshidrataron mediante una serie progresiva de diferentes concentraciones en etanol (35%, 50%, 75%, 96% y absoluto), manteniéndose en cada concentración de alcohol durante 20 minutos.

6.-Inclusión: Se siguió el siguiente procedimiento;

a) Oxido de propileno, dos cambios de 30 minutos cada uno.

III. Material y métodos

b) Oxido de propileno – Resina Spurr (1:1), durante 90 minutos.

c) Resina Spurr, durante 24 horas.

7.-**Solidificación:** Las muestras se colocaron en moldes pretallados (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y rellenos con resina Spurr (Spurr 1969), posteriormente se colocaron en una estufa a 68°C durante un mínimo de 16 horas. Una vez obtenidos los bloques se tallaron y se realizaron cortes ultrafinos en un ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) Los cortes fueron montados en rejillas de cobre y contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Leica LMR en campo claro (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Los análisis morfométricos se realizaron usando el sistema de análisis Qwin de Leica.

13.2. Inclusión en JB4 para la observación microscópica de pericarpo de fruto

Secciones del pericarpo de frutos en estadio verde inmaduro se procesaron inmediatamente mediante el siguiente protocolo.

Para la inclusión en resina se ha utilizado el sistema denominado JB4 (Polyscience), compuesto de tres elementos: i) la resina; ii), un agente polimerizador, y iii), un catalizador. La resina es miscible en agua, lo que permite el procesado completo de la muestra sin su total deshidratación. El protocolo a seguir fue el siguiente:

1.- Fijación Las muestras se trataron con el fijador FAA/Tritón-X100 (ácido acético glacial 5%, formalina 1,75%, etanol 50%, Tritón-X100 1%).

2.-Vacío: se sometieron a vacío (500 mb, 45 min).

3.-2ª Fijación: Se reemplazó el fijador por otro recién preparado y se dejó a temperatura ambiente durante 1 h.

4.-Deshidratación: se eliminó el fijador y se trató inicialmente con etanol 70% durante toda la noche a 4°C. Se prosiguió la deshidratación sometiendo las muestras a series de 2 h en etanol en concentraciones crecientes (80%, 90% y 95%).

5.-Tinción: Para poder visualizar la muestra, se añadió safranina (0,5% m/v, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) al etanol 95%, dejando de nuevo a 4°C durante toda la noche.

6.-Lavado: Al día siguiente, para eliminar la sobretinción, se lavaron las muestras con etanol 95% durante 2 h a temperatura ambiente.

7.-Inclusión:

-se preparó la solución de la resina activa, disolviendo 1,25 g del catalizador C (peróxido de benzoilo, Polyscience) en 100 ml de la solución de la resina (i), con agitación.

- se elaboró una mezcla 1:1 de etanol 95% y solución de resina, añadiéndola a las muestras tras eliminar el etanol 95%.

-Se incubó a temperatura ambiente durante 3 h, se sustituyó esta mezcla por solución de resina activa y se mantuvo de nuevo a temperatura ambiente durante 3 h adicionales.

-Solidificación: Se mezclaron 25 ml de resina activa con 1 ml de solución de polimerización (ii) en un tubo falcon de 50 ml, y se añadió a los moldes (*molding cup tray*, Polyscience) en los que se encontraba la muestra tras ser incubada con la resina activa.

Los moldes se incubaron, envueltos en plástico transparente de uso alimentario, a 55°C en un horno de hibridación, favoreciendo así la polimerización, y se pegaron, en la orientación adecuada, a cilindros de aluminio con un adhesivo instantáneo (Loctite, Henkel).

Las secciones histológicas de 3-4 µm obtenidas en el microtomo (2050 Supercut, ReichertJung, Cambridge Instruments GmbH) se tiñeron con azul de toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) al 1% y ácido bórico al 0,6%. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio Leica LMR en campo claro (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Los análisis morfométricos se realizaron usando el sistema de análisis Qwin de Leica.

14. Análisis de calidad de fruto

Se recolectaron frutos rojos maduros que se distribuyeron en tres bandejas para cada genotipo, a razón de 10 frutos por bandeja. Se determinaron los siguientes parámetros: diámetro de fruto, peso del fruto, contenido de agua, potencial osmótico, firmeza mediante resistencia a la compresión, integridad de las membranas celulares mediante la fuga de electrolitos, color por colorimetría, contenido en sólidos solubles por refractometría, acidez valorable, índice de maduración o sabor, tasa de respiración, tasa de producción de etileno, azúcares y ácidos orgánicos por HPLC-IR/VIS, aminoácidos libres por HPLC-MS, y minerales por ICP-EOS.

14.1 Etileno y actividad respiratoria

El etileno se midió mediante GC-FID de acuerdo con se realizó acorde a Sanchez-Bel et al. (2012). La determinación de la producción de etileno y CO₂ se realizó colocando 10 frutos en un recipiente herméticamente cerrado, de volumen conocido y provisto de un septum de silicona. Al cabo de 1h se extrajo, a través del septum con una jeringa de 1mL de la atmosfera interna del recipiente para la determinación del etileno y el CO₂ respectivamente. Se hicieron 3 medidas por cada recipiente.

El etileno se cuantificó en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo HP 5890, provisto de un detector de ionización de llama y un registrador Hewlett-Packard modelo HP 3390^a, siendo la columna de acero inoxidable de 3 m de longitud y 1/8" de diámetro, con relleno de alúmina activada de 80/100 mallas. Los flujos del gas portador (nitrógeno), de hidrógeno y de aire fueron 32, 26 y 400 mL/min, respectivamente, y las temperaturas de la columna, inyector y detector 70, 150 y 175°C, respectivamente. La cuantificación se realizó mediante el método de calibración punto a punto con un estándar externo. Cada fruto se analizó por duplicado y los resultados se expresaron como nanolitros de etileno producido por gramo de peso fresco y hora (nL·g⁻¹·h⁻¹)

La cuantificación CO₂ se realizó directamente en el espacio de cabeza del recipiente, 1 h después del cierre, utilizando un analizador por IR de CO₂ y O₂ del espacio de cabeza de sobremesa (PBI Dansensor, jaque mate 9900), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó mediante el método de calibración punto a punto con un estándar externo (de 100 ppm). La atmosfera de cada recipiente fue analizada por triplicado. Los resultados se expresaron en miligramos de CO₂ emitidos por kilogramo de peso fresco y hora (mg·kg⁻¹·h⁻¹).

14.2. Medida de la firmeza

La firmeza de los frutos se realizó de acuerdo con Sanchez-Bel et al. (2012) y se midió por compresiometría utilizando el equipo Durofel (Copa-Technologie CTIFL, 13103 St-Etienne du Gres, Francia), utilizando un vástago calibrado de 0,25 cm² y expresando el resultado como porcentaje de la resistencia a la compresión, considerando el 100% como el valor de la resistencia de una superficie indeformable. Para cada fruto se realizaron 4 medidas, separadas 90° entre sí, a 1,5 cm del borde exterior del fruto cortado por la zona ecuatorial. Los resultados se expresaron en porcentaje de resistencia a la compresión.

14.3. Contenido en sólidos solubles totales

La escala Brix es una escala hidrométrica para medir el porcentaje de azúcar y otros sólidos disueltos en soluciones. La determinación de los sólidos solubles se realizó mediante refractometría, estimando el índice de refracción con un refractómetro digital (PR-101 de Atago, Tokio, Japón). El refractómetro convierte el índice de refracción en concentración de azúcar como unidades de porcentaje por peso, que se expresan como %Brix. El contenido en sólidos solubles totales se correlaciona con el contenido en azúcares reductores. El método consistió en triturar la pulpa del fruto y filtrar el triturado con una gasa recogiendo la fase líquida. También se realizaron medidas a partir de extracto crudo fresco de fruto obtenido por centrifugación. Se toma la medida de forma automática y se anota directamente.

14.4. Medida de la acidez valorable

Las muestras de pulpa de fruto previamente troceada y congelada se descongelan y trituran hasta homogeneización. Se pesan aproximadamente 5 g, se anota y se dispone dicho homogenado en un vaso de precipitado. La muestra se diluye hasta volumen final de 50 mL con agua destilada y se mantiene en agitación durante 30 min. Seguidamente se midió la acidez valorable utilizando un valorador automático de acidez (modelo 686 de Metrohm, Metrohm AG, Ionenstrasse, CH-9100 Herisau, Suiza). Se valoró el zumo resultante con NaOH 0,1 N hasta pH 8,1. Con la cantidad de NaOH factorizada añadida (mL) se calcula el % de ácido valorable expresado como ácido cítrico en el caso del tomate (g de ácido cítrico por 100 mL).

$$\text{Acidez valorable} = (\text{mL NaOH} \cdot 0,1\text{N} \cdot 1\text{Fac} \cdot 6,4) / \text{Peso de partida}$$

14.5. Índice de Maduración

También conocido como índice de sabor, es un ratio entre contenido de azúcares y de ácidos del fruto (Bisogni et al., 1976). El índice de maduración se obtiene del cociente entre el contenido en sólidos solubles totales y la acidez valorable, de acuerdo con la siguiente formula:

$$\text{Índice de maduración} = \text{Contenido en sólidos solubles} / \text{Acidez valorable}$$

14.6. Determinación de azúcares y ácidos orgánicos

Para la determinación individual de los azúcares y el análisis de los distintos ácidos en el material vegetal se siguió el protocolo descrito en Sanchez-Bel et al. (2012). se realizó mediante un equipo de cromatografía líquida de alta resolución HPLC modelo LC-10Atvp (Shimadzu, 604-8511 Kyoto, Japón) equipado con una bomba, un inyector automático, un horno, un detector de índice de refracción (RID) (modelo RID-10A de Shimadzu) para el análisis de azúcares y un espectrofotómetro

UV/visible para la detección de ácidos orgánicos (modelo SPD-10Avvp de Shimadzu). Una dilución del extracto obtenido por centrifugación para el análisis del potencial osmótico se purificó primero por cartuchos Chromafix SPE Octadecyl C₁₈ ec (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y a continuación se filtró por filtros de celulosa de acetato de 0,45 µm Chromafil® Xtra CA45/25 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). El extracto obtenido fue el utilizado en la determinación de azúcares y ácidos orgánicos. Para la separación de los distintos azúcares y ácidos orgánicos se utiliza una columna de intercambio iónico ICE Coregel 87H3 (Transgenomic, EE.UU), utilizando como fase móvil H₂SO₄ 0,1 N. El área de los cromatogramas se integró y cuantificó utilizando el software de análisis DataAnalysis LC/MSD Trap Version 3.2 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania). La identificación y cuantificación de los azúcares y ácidos orgánicos se ha llevado a cabo mediante curvas de calibración con patrones de 3000, 2400, 1200, 600, 300 y 150 ppm para cada metabolito analizado. Las condiciones de trabajo del HPLC fueron las siguientes (ver **tabla 10**):

Tabla 10. Condiciones de trabajo para HPLC

Fase móvil	H ₂ SO ₄ 0,1 N
Flujo (mL/min) (en régimen isocrático)	0,4
Presión de la bomba (psi)	0,745
Temperatura de la columna (°C)	37
Volumen de inyección (µL)	20
Tiempo de medición por muestra (min)	30

14.7. Determinación de aminoácidos libres

A partir de extractos crudos obtenidos por centrifugación y siguiendo el mismo protocolo de preparación de muestras para la técnica HPLC, se realizó el análisis de aminoácidos libres. Los extractos filtrados obtenidos se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución/espectrometría de masas (HPLC-MS) en un equipo Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.) equipado con un inyector automático de muestras termostaticado con una bomba

capilar conectada a una trampa iónica Agilent Ion Trap XCT Plus Mass Spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.) utilizando un sistema de electrospray (ESI). Este análisis se llevó a cabo en la plataforma de metabolómica del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia (SAI-UMU). Como patrones se utilizaron concentraciones conocidas de cada aminoácido (10, 25, 50, 75 y 100 μM).

15. Ensayo de conservación postcosecha de frutos

La capacidad de conservación postcosecha de frutos de tomate se evaluó en las siguientes condiciones:

- -Ensayo de conservación a temperatura ambiente (22°C)
- -Ensayo de conservación a bajas temperaturas (4°C)
- -Ensayo de conservación a bajas temperaturas con reacondicionamiento posterior a temperatura ambiente (22°C)

En el ensayo de conservación a temperatura ambiente se disponen los frutos, inmediatamente tras su recolección y selección por su homogeneidad y ausencia de daños y alteraciones visuales, en bandejas (3 bandejas por genotipo con 10 frutos en cada una). Los frutos se mantuvieron en una cámara de conservación en oscuridad a las temperaturas antes mencionadas y a una humedad relativa del 90%, y se determinó (i) la pérdida de peso que se expresó en % con respecto al peso inicial el día de la recolección, y (ii) el estado visual de los frutos afectados mediante una escala arbitraria (el número de frutos con depresiones y arrugamientos en su superficie con respecto al total de la muestra expresado en %) durante 2, 4 y 7 días.

Siguiendo el mismo esquema se realizó el ensayo de conservación a bajas temperaturas de la misma forma pero con la diferencia de que la temperatura de la cámara de conservación se fijó a 4°C. En este caso tanto con frutos del día 0 como del último día de conservación se procedió al troceado de su pulpa para liofilizar. Con el material liofilizado se procedió a la determinación de la peroxidación de lípidos.

La única diferencia del tercer ensayo de conservación fue que tras 7 días a 4°C los frutos se transfirieron a una cámara de conservación a temperatura ambiente (22°C) pero con la misma condición de humedad relativa que en los anteriores ensayos (90%). Esa etapa de reacondicionamiento duró 3 días con lo que la duración completa del ensayo fue de 10 días. Al final del ensayo se procedió al troceado de la pulpa de los frutos para liofilizarla. Con el material liofilizado se procedió a la determinación de la peroxidación de lípidos.

Los tres tipos de ensayo de conservación postcosecha se repitieron con frutos procedentes de 2 campañas de cultivo independientes.

15.1. Método de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) para la determinación del índice de peroxidación de lípidos en fruto de tomate, expresado mediante la producción de malonil-dialdehído (MDA)

El método descrito es una modificación del protocolo descrito en Martínez-Solano et al. (2005). Se pesó aproximadamente 0,2 g de pulpa de fruto liofilizada y molida y se añadió 4,0 mL de ácido tricloroacético 0,1% (TCA). A continuación se homogeneizó en Vortex y se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 20 min. a 20°C. Se tomaron 0,5 mL del sobrenadante que se transfirió a un tubo Eppendorf de 2,0 mL en el que se practicaron dos agujeros en la tapa. Se añadieron a estos 1,5 mL de ácido 2 tio-barbitúrico 0,5% (TBA) en 20% TCA. Los tubos se incubaron en un baño a 90°C en agitación durante 30 min. Posteriormente se detuvo la reacción de formación de malonil-dialdehído (MDA) introduciendo los tubos Eppendorf en un baño de hielo durante 5 min. Seguidamente se centrifugaron a 14000 r.p.m. durante 10 min. a 4°C y se transfirió 1 mL del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL. Finalmente se midió la absorbancia de la solución resultante a las longitudes de onda de 532 y 600 nm utilizando como referencia el reactivo 0,5% TBA en 20% TCA. La fórmula para calcular la producción de MDA:

$$\mu\text{mol MDA}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1} = (2\cdot(m+V)\cdot\Delta\text{Abs})/(m\cdot b\cdot E)$$

III. Material y métodos

m = peso en g de tejido tomado para el análisis, (si es liofilizado hay que hacer la conversión para expresar los resultados en peso fresco)

V = volumen de extractante utilizado en el ensayo (0.1% TCA)

b = camino óptico de la cubeta del espectrofotómetro (por regla general es 1 cm)

E = coeficiente de extinción molar del MDA (155 mM⁻¹·cm⁻¹)

ΔAbs = (Abs_{532nm} – Abs_{600nm}) (La Abs a 600 nm no es específica del MDA, que es la Abs a 532 nm, si no de interferentes; la sustracción de valores de Absorbancias a dichas longitudes de onda elimina el efecto de dichos interferentes)

El '2' se debe al tiempo de reacción que en el protocolo es media hora, y aparece en la fórmula para poder expresar la producción de MDA por hora. Se puede expresar asimismo como nmol MDA·g⁻¹·h⁻¹ multiplicando el valor resultante de aplicar la anterior formula por 1000.

16. Métodos de Biología Molecular

16.1. Extracción DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico (gDNA) se usa una modificación del protocolo de extracción descrito por Rogers (1985). Se utilizó 0,1 g de material vegetal congelado en N₂ líquido que se dispuso en un tubo de 1,5 mL y se molió mediante un pistilo estéril. Se le añadió el tampón de extracción (0,2% β-mercaptoetanol, 100 mM Tris-HCL pH 8, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS) y la solución se incubó a 65°C durante 5 minutos, tras lo cual se añadieron 150 μL acetato potásico 5 M. Se sometió a agitación y se dejó incubar en hielo durante 15 minutos, para finalmente centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El DNA que se localiza en el sobrenadante se recogió y se precipitó con isopropanol a -20°C, manteniendo la solución durante 12 horas a -20°C y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se lavó varias veces con etanol (70%) a -20°C. Por último, se resuspendió el precipitado en agua destilada estéril (25-50 μl).

16.2. Cuantificación de Ácidos nucleicos (DNA y RNA)

La concentración del DNA y RNA extraído se estimó mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies, EE.UU.) con los valores de absorbancia a las longitudes de onda 280 y 260 respectivamente. Las relaciones DO_{260}/DO_{280} y DO_{260}/DO_{230} se utilizaron para comprobar la calidad del extracto estimando la contaminación de los ácidos nucleicos por proteínas y fenoles por el primer ratio, y por azúcares por el segundo. Se considera que una extracción de ARN es de alta pureza cuando el ratio DO_{260}/DO_{280} se encuentra próximo a 2,0 pero no inferior a 1,8 y el DO_{260}/DO_{230} se encuentran entre 2,0-2,2.

16.3. Amplificación por PCR

La presencia o ausencia de los genes marcador (*nptII*) y delator (*uidA*) se comprobó mediante PCR. Los volúmenes y concentraciones usados se muestran en la **tabla 11** y los ciclos de temperatura y utilizados están descritos en la **figura 19**. Se diseñaron cebadores específicos para cada gen (**tabla 12**).

Tabla 11. Composición de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR:

Componente	Volumen/Reacción	Concentración
Aqua destilada-esterilizada	15 μ L	
Tampón 10X (con Mg^{2+})	2 μ L	1X
dNTP (10 mM)	0,8 μ L	400 μ M
Cebador A (20 μ M)	0,5 μ L	0,5 μ M
Cebador B (20 μ M)	0,5 μ L	0,5 μ M
Taq Polimerasa (5U· μ L ⁻¹)	0,2 μ L	1 U
Muestra ADN	1 μ L	<100 ng/reacción
Volumen de reacción	20 μ L	

Tabla 12. Cebadores usados para la amplificación de las secuencias *nptII* y *uidA*.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Amplicon (pb)
nptII-F	ATCCATCATGGCTGATGCAATGCG	Presencia T-DNA 253
nptII-R	CCATGATATTCGGCAAGCAGGCAT	
uidA-F	TGGGCATTCAGTCTG	Presencia T-DNA 509
uidA-R	GTGATATCGTCCACCCA	

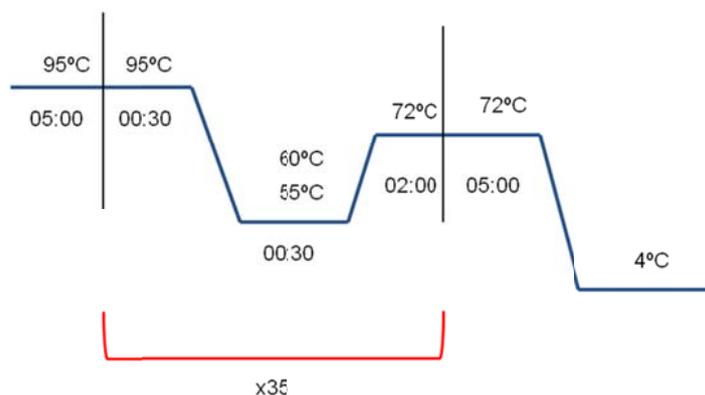


Figura 19. Programa de ciclos de reacción de la PCR. La temperatura de hibridación para *nptII* es 60°C y para *uidA* es 55°C.

16.4. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Se ha realizado según Sambrook and Russell (2001). Los fragmentos de DNA, procedentes de digestiones con enzimas de restricción o de reacciones de PCR, a partir de gDNA así como de RNA total aislado, se separaron en geles horizontales de agarosa del 0,8-2,0% (p/v), dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. El tampón utilizado fue el SB (Brody and Kern, 2004) y los geles se tiñeron con una solución de Bromuro de Etidio ($50 \mu\text{L}^{-1}$) durante 10-15 minutos que posteriormente se expusieron a luz UV para visualizar las bandas. Las muestras de DNA o RNA se prepararon en tampón de carga (sacarosa 8,33% (p/v), Azul de Bromofenol 0,04%, EDTA 0,017 M) para luego cargar en los pocillos del gel (10 μL). La separación electroforética se realizó en el mismo tampón utilizado para la preparación del gel, a voltaje constante (100 V) durante 60-70 minutos.

El tamaño de los fragmentos de interés se estimó por comparación con un marcador comercial (GeneRuler™ 100bp DNA ladder, Thermo Scientific). Los geles de agarosa fueron fotografiados realizó en una estación de análisis de imagen (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

16.5. Genotipado

Una vez conocida las secuencias flanqueantes al inserto T-DNA en el mutante en estudio tras el clonaje por Anchor-PCR es posible comprobar mediante PCR en las

progenies segregantes si el inserto (alelo mutante) está en homocigosis, heterocigosis o acigosis en cada una de las plantas (la mera presencia o ausencia del inserto T-DNA se puede comprobar según se describe en el **Apartado 21.4**). De esta manera se puede correlacionar la homocigosis, hemicigosis y acigosis para el alelo mutante con el fenotipo mutante y así confirmar si la mutación responsable del fenotipo detectado está etiquetada por el inserto o no (**figura 20**). Con este fin se han diseñado cebadores específicos para los mutantes que son objeto de estudio de esta tesis doctoral, *wak1* y *afs1* (**tabla 13**).

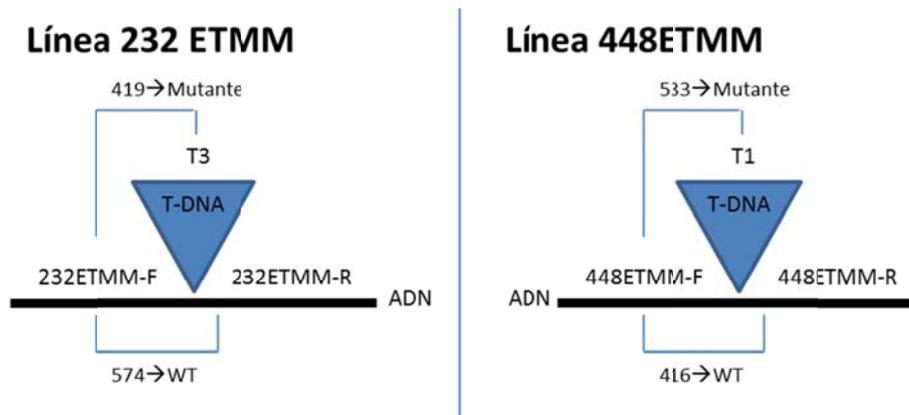


Figura 20. Esquema de funcionamiento de la técnica para el genotipado. Los números indican el tamaño de la banda resultante en la electroforesis para el alelo mutante (con inserto T-DNA) y WT (sin inserto)

También se diseñaron diferentes parejas de cebadores con el fin de detectar la posible inserción de regiones del cuerpo del vector pD991 junto con la cassette T-DNA (**figura 20**). Todos los cebadores usados en la detección de *nptII*, *uidA*, genotipado y detección de zonas flanqueantes al inserto de T-DNA fueron diseñados por el grupo de investigación de Genética del Prof. Rafael Lozano de la Universidad de Almería (**tabla 14**). Este grupo se encargó asimismo de los análisis de Southern Blot para detectar el número de insertos presentes en los mutantes en estudio, de Anchor-PCR para clonar las regiones flanqueantes al inserto T-DNA (en el caso de mutantes con un solo inserto) y de PCR para detectar la presencia del cuerpo del vector así como del inserto en el genoma de los mutantes en estudio.

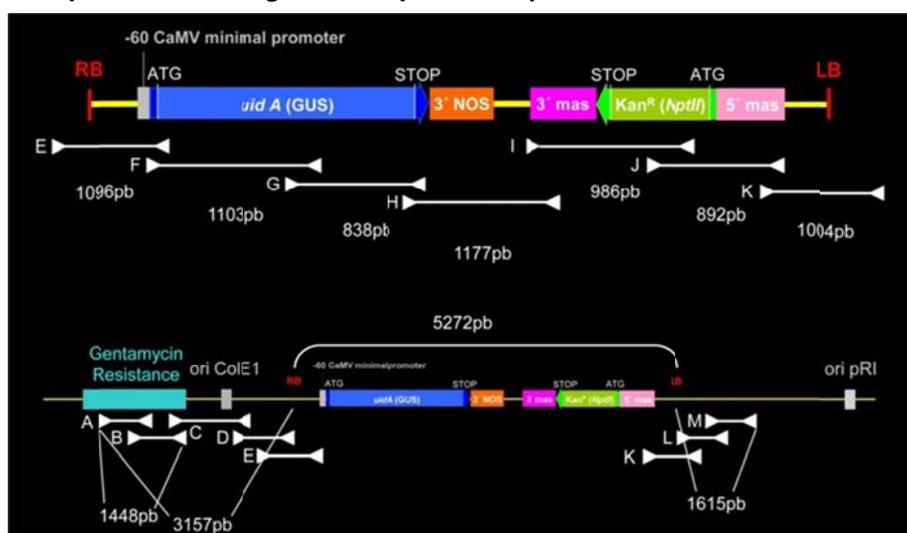
Tabla 13. Cebadores utilizados para el genotipado de poblaciones de los mutantes 232ETMM (*wak1*) y 448ETMM (*afs1*).

Nombre	Secuencia 5'→3'		amplicon (pb)
232ETMM-F	CGTAGCTCCTATTCCCACCA	Genotipado 232ETMM	Mut (F-tail3): 419 WT(F-R): 574
232ETMM-R	CTTCGTTACCCATGTATTTTCA		
Tail3	CTGGCGTAATAGCGAAGAGG		
448ETMMgt1-F	CTTGAGACGTGGACAAACGA	Genotipado 448ETMM	Mut (F-T1): 533 WT(F-R): 466
448ETMMgt1-R	AAATTTCTGTTTGGATGAGCTTC		
T1	ACAGTTTTCGCGATCCAGAC		

Tabla 14. Cebadores utilizados para determinar la presencia del T-DNA y las regiones flanqueantes del vector pD991.

pD991-A-F	TACGGCCACAGTAACCAACA	pD991-G-R	CAGGAGAGTGGGCTGATTC
pD991-A-R	TAAGACATTCATCGCGCTTG	pD991-H-F	GAATACGGCGTGGATACGTT
pD991-B-F	TCACCGTAATCTGCTTGAC	pD991-H-R	TGTGCGTGGCTTTATCTGTC
pD991-B-R	CCTTGCCGTAGAAGAACAGC	pD991-I-F	GTCGGGTCACTACGCATCAT
pD991-C-F	AGCTTGGCGTAATCATGGTC	pD991-I-R	TGCTCCTGCCGAGAAAGTAT
pD991-C-R	GCCTACATACCTCGCTCTGC	pD991-J-F	GCTCTTCGTCCAGATCATCC
pD991-D-F	CAACCCGGTAAGACACGACT	pD991-J-R	TTCAAATCAGTGCGCAAGAC
pD991-D-R	GACCTCAATTGCGAGCTTTC	pD991-K-F	GAAACAGAATACCCGCGAAA
pD991-E-F	GTCACGGTCTTGTGTCTCT	pD991-K-R	CTCGATTGTACTGCGTTCA
pD991-E-R	TCTGCCAGTTCAGTTCGTTG	pD991-L-F	TTGCATGTTGGTTTCTACGC
pD991-F-F	GATCGCGAAAAGTGTGGAAT	pD991-L-R	TATAGCGCCGTAGAGCGTTT
pD991-F-R	TTTTTGTACGCGCTATCAG	pD991-M-F	AAAGCAGCGCCTGTAGTTGT
pD991-G-F	CCCTACGCTGAAGAGATGC	pD991-M-R	TCGACCGCAGATAACCTACC

Figura 20. Esquema de las regiones amplificadas por los cebadores de la tabla 12



16.6. Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se llevó a cabo a partir de 100 mg de material previamente congelado en N₂ líquido (almacenado a -80°C) con el sistema RNeasy® Plant Minikit (Qiagen) utilizando los reactivos e instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del ARN extraído se estimó por espectrofotometría (Nanodrop® Spectrophotometer – Nanodrop Technologies) a una longitud de onda de 260 nm y se comprobó su calidad por electroforesis en gel de agarosa al 1%, siguiendo los protocolos descritos en los **Apartados 21.2 y 21.5**.

16.7. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se usó el kit comercial iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BIO-RAD) partiendo de 100 ng de ARN total y siguiendo las especificaciones del fabricante.

16.8. PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizó en un equipo RotorGene 3000 (QIAGEN, Holanda) y utilizando el kit comercial de RotorGene SYBR Green PCR (QIAGEN, Holanda) y siguiendo las especificaciones del fabricante.

El protocolo de amplificación utilizado fue: ciclo 1 (1X) de activación de la polimerasa, 95°C, 5 minutos; ciclo 2 (40X), desnaturalización a 95°C, 5 segundos, hibridación a 60°C, 30 segundos, ciclo 3: 4°C, indefinido. (**Figura 22**). La composición de la mezcla de reacción se describe en la **tabla 15**.

Tabla 15. Reactivos, volúmenes y concentraciones utilizado en la qPCR.

Componente	Volumen de reacción	Concentración
Aqua RNase free	8.5 µL	
MasterMix 2X	11.5 µL	1X
Cebador A (10 µM)	1µL	1 µM
Cebador B (10 µM)	1µL	1 µM
Muestra ADN o ADNc	1 µL	<100 ng/reacción
Volumen de reacción	25 µL	

III. Material y métodos

La expresión relativa del gen se calculó mediante el método del $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001), en el que se comparan directamente los Ct s del gen testado y gen endógeno normalizador ($\Delta Ct = Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ gen normalizador}$) en cada muestra, y posteriormente se comparan los ΔCt de la muestras problemas con respecto a la muestra de referencia ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ problema} - \Delta Ct \text{ referencia}$) a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa génica} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

El Ct es el ciclo umbral en el que la fluorescencia de la muestra excede un valor umbral elegido, es decir, el ciclo en el cual el sistema comienza a detectar el incremento de la señal asociada con un aumento exponencial del producto de PCR durante la fase lineal logarítmica, y cuyo valor será inversamente proporcional a la cantidad de ADNc inicial. Como gen normalizador se utilizó *EF1 α* (*Elongation Factor 1 α* accesión de GenBank AB061263), cuya expresión era constitutiva en el tomate y no se vió modificada por los tratamientos de estrés aplicados a las plantas. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias por comparación con la muestra de referencia calibradora, generalmente WT, a cuyo nivel de expresión se le daba el valor de 1.

Se diseñaron cebadores específicos (**tabla 19**) para la cuantificación de la expresión de los distintos genes de interés. Todos los cebadores fueron sintetizados por Life Technologies (Madrid, España) y se calculó la eficiencia de cada pareja mediante el método de diluciones seriadas de las muestras para obtener el valor de la pendiente de la recta que resulta de representar $Ct/\text{Log Input}$ (Eficiencia = $10^{(-1/\text{slope})} - 1$).

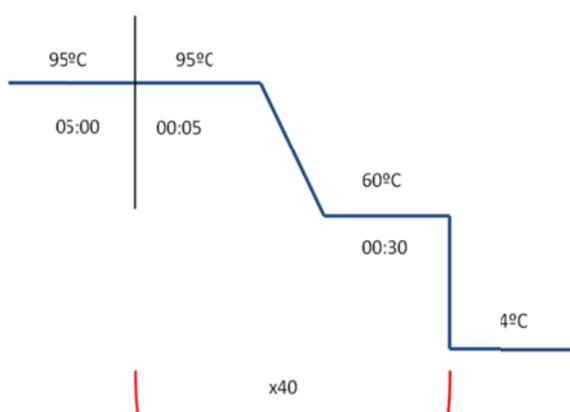


Figura 22. Programa de ciclos de reacción de la qPCR.

	Secuencia 5'→3'	Amplicon (pb)	Efi %	Locus	Publicado
LeEF1α-F	GACAGGCGTTCAGGTAAGGA	119	99,8	LOC101244084	Asins et al.,2013
LeEF1α-R	GGGTATTCAGCAAAGGTCTC				
SIWAK2-F	TTTTCAACACAACGATGCAAA	100	113	Solyc09g014710	--
SIWAK2-R	TCAAATCGACTACCTTCACCA				
SIWAK1-F	GGTTGTGATGACGGTGCTAT	113	99	Solyc09g014720	--
SIWAK1-R	CAGCAACCAAAACCCATACA				
SIWAK3-F	TGTGGGAACATCACAATTCC	108	103	Solyc09g014730	--
SIWAK3-R	TGTTGGAGTCCCTGTGCGATT				
SISOS1-F	TCGAGTGATGATTCTGGTGG	129	107	Solyc01g005020	Asins et al.,2013
SISOS1-R	GACGCCTTTCCACACTCTGAT				
SIHKT1.1-F	TCTAGCCCAAGAACTCAAT	178	107	LOC101245180	Asins et al.2013,
SIHKT1.1-R	CTAATGTTACAACCTCCAAGGAATT				
SIHKT1.2-F	TGAGCTAGGGAATGTAATAAACG	188	97	Solyc07g014680.2.1	Asins et al.,2013
SIHKT1.2-R	AGAGAGAACTAACGATGAACC				
SITIV1-F	AAACTCCGCCTCTCGTTACA	103	100	Solyc03g083910.2.1	--
SITIV1-R	CAAAGGAAAACGGAGAGGA				
SILIN6-F	TTCTTCTTTGGGCTTTGC	132	114	Solyc10g083290.1.1	--
SILIN6-R	TGGACCTTGCTAGCATCAAC				
SIINH-F	GTATGCCAGAAGCATTAGAAGCA	82	--	LOC543729	Zhang et al., 2013
SIINH-R	GCATCACCAGAAGAACCAACC				

Tabla 16. Cebadores para PCR cuantitativa en tiempo real utilizados para la cuantificación de la expresión de los genes de interés.

17. Tratamiento estadístico

Se llevaron a cabo los análisis estadísticos los métodos estandarizados que ofrece el programa SPSS 19.0. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar (ES) y se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) para comprobar si había diferencias significativas entre medias. En el caso de haberlas se aplicó el test de la LSD (test mínima diferencia mínima) considerando un nivel de confianza de $p < 0,05$ (5%) para identificar dichas diferencias entre varias medias. En el caso de estudiar si había diferencias significativas entre pares de medias se aplicó el test *t* de Student considerando también un nivel de confianza de $p < 0,05$. Para el análisis genético de

III. Material y métodos

poblaciones segregantes con el fin de comprobar si la mutación responsable del fenotipo es monogénica y dominante o recesiva se aplicó el test χ^2 .

Capítulo I: Resultados

Capítulo I:

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE DE TOMATE *afs1* AFECTADO EN EL DESARROLLO REPRODUCTIVO

1. Identificación del mutante de tomate *afs1* (*abnormal fruit set 1*)

1.1. Detección de un fenotipo mutante afectado en el desarrollo reproductivo

En un escrutinio llevado a cabo en condiciones de cultivo en invernadero de poblaciones segregantes TG2 de la colección de mutantes de tomate cv MoneyMaker se identificó una línea con un desarrollo reproductivo anómalo. Los individuos TG2 que exhibían este fenotipo presentaban flores con el cono estaminal engrosado o incluso abriéndose por su base, indicando cuaje de fruto. En éstos se observaba como el ovario había engrosado de forma manifiesta. Debido a este hecho el mutante se denominó *afs1* (*abnormal fruit set 1*, del inglés cuaje anormal de fruto 1). También las flores de dichas plantas tenían aparentemente un mayor tamaño, y los frutos presentaban un aspecto muy particular donde los pétalos quedaban adheridos a la superficie, permaneciendo incluso después del viraje de color al iniciar éstos su maduración (**figura 23**).

Además, en el mutante se observó una tasa de cuajado de fruto sensiblemente mayor que en plantas de tomate del mismo genotipo no sometidas a mutagénesis insercional y por tanto no transformadas (WT). Finalmente, los frutos del mutante no poseían semillas en la mayoría de los casos, o bien la cantidad obtenida era mínima comparada con frutos WT, indicando que la línea presenta partenocarpia. En este particular, al estudiar el interior de los frutos se observó que *afs1* producía primordios seminales que no llegaban a dar semillas totalmente desarrolladas (**figura 23**).

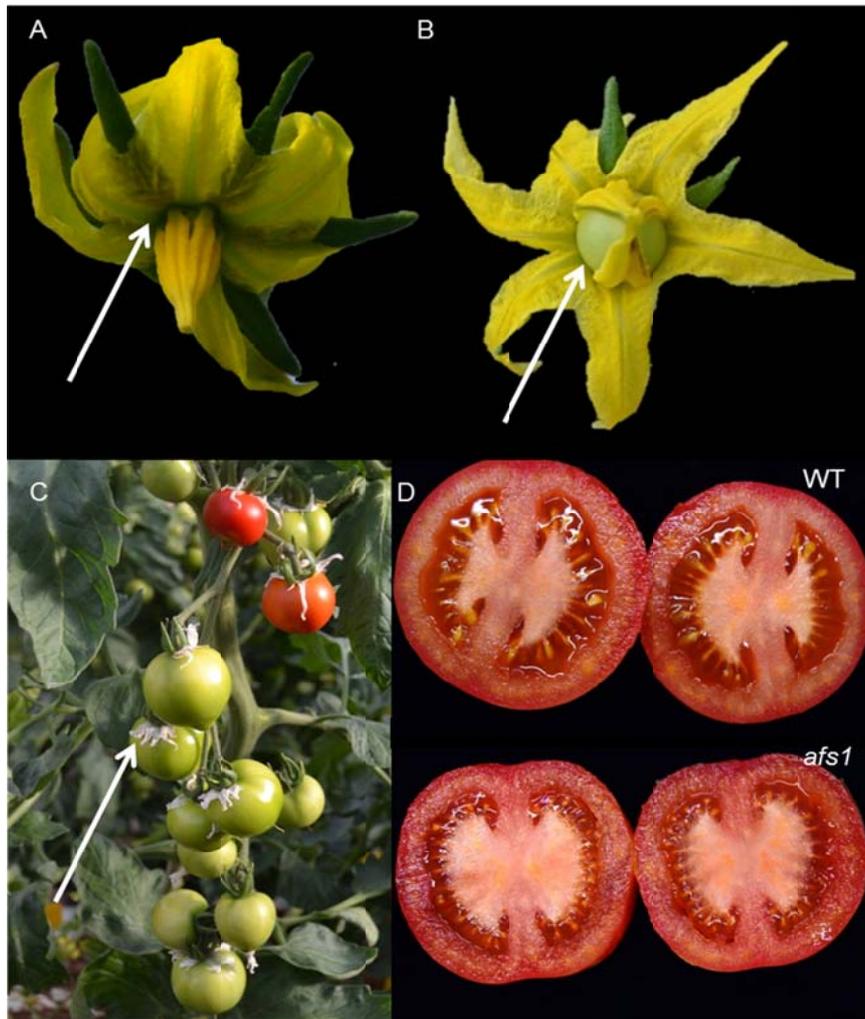


Figura 23. Identificación del mutante *afs1*. (A) Aspecto de la flor *afs1*; se observa como el cono estaminal se abre por la base. (B) El crecimiento del fruto cuajado de *afs1* continúa de forma muy pronunciada reventando la base del cono estaminal. (C) Frutos *afs1* con los pétalos adheridos a su superficie, incluso cuando los frutos viran de color verde a rojo al iniciar su maduración. (D) Comparación de frutos *afs1* y WT seccionados ecuatorialmente donde se observa como los primeros presentan primordios seminales que no llegan a desarrollarse en verdaderas semillas como en WT.

1.2. Análisis genético del mutante *afs1*

Este fenotipo mutante afectado en el desarrollo reproductivo no se ha observado en plantas *afs1* de la generación transformante TG1 procedentes del cultivo *in vitro*, que eran indistinguibles de plantas WT también procedentes de *in vitro*. El análisis genético mediante el test χ^2 de la segregación fenotípica de *afs1* se estudió primero en una generación segregante TG2 constituida por 25 individuos, donde se

observó una segregación 20 WT : 5 *afs1*, resultando una χ^2_{1gl} de 0,33 para la hipótesis de partida de una segregación fenotípica acorde con una distribución 3 WT : 1 *afs1*. Posteriormente se llevó a cabo otro análisis similar con una segunda población TG2 compuesta por 24 individuos, donde la segregación resultó ser 21 WT : 3 *afs1*, donde la aplicación del test para una segregación esperada 3 WT : 1 *afs1* dio como resultado una χ^2_{1gl} de 2,00. Finalmente en una tercera población TG2 de 22 miembros analizada para el fenotipo se observó una distribución de 18 WT : 4 *afs1*, resultando una χ^2_{1gl} de 0,55. El análisis genético mediante dicho test χ^2 sugiere que la mutación *afs1* es monogénica y recesiva (**tabla 17**).

Muestra 1 (3:1)	WT	<i>afs1</i>
Observado	20	5
Esperado (3:1)	18,75	6,25
$\chi^2 M1_{1gl} = 0,33$		

Muestra 2 (3:1)	WT	<i>afs1</i>
Observado	21	3
Esperado (3:1)	18	6
$\chi^2 M2_{1gl} = 2,00$		

Muestra 3 (3:1)	WT	<i>afs1</i>
Observado	18	4
Esperado (3:1)	16,5	5,5
$\chi^2 M3_{1gl} = 0,55$		

Datos acumulados (3:1)	WT	<i>afs1</i>
Observado	59	12
Esperado (3:1)	53,25	17,75
$\chi^2 DA_{1gl} = 2,48$		

$\chi^2 H_{2gl} =$	0,40
--------------------	------

$\chi^2_{1gl} (5\%) =$	3,84
$\chi^2_{2gl} (5\%) =$	5,99

Tabla 17: Análisis genético del mutante *afs1*. Test χ^2 del análisis de segregación fenotípica de progenies TG2 del mutante. Ajuste a modelos de segregación. M1, muestra 1; M2, muestra 2; M3, muestra 3; DA, Datos acumulados; H, homogeneidad; gl, grados de libertad.

Por lo que respecta a la homogeneidad de las segregaciones observadas en las tres muestras, el análisis de homogeneidad indica que no hay motivos para dudar de que las muestras sean homogéneas ($\chi^2 H_{2gl}$ de 0,40). Finalmente el análisis

de datos acumulados también revela que no hay motivos para cuestionar la hipótesis de partida (χ^2 DA_{1gl} de 2,48), es decir, una segregación fenotípica acorde con una distribución 3 WT : 1 *afs1* (**tabla 17**). El resultado de este análisis genético indica que es altamente probable que la mutación *afs1* sea monogénica y recesiva.

1.3. Análisis molecular del mutante *afs1*

Tras seleccionarse el mutante en base a su fenotipo, que presenta rasgos de gran interés agronómico tales como la partenocarpia y la elevada tasa de cuaje de fruto, se llevó a cabo la caracterización molecular de la línea. Este trabajo se llevó a cabo en la Universidad de Almería por el Dr. Fernando Yuste, en el grupo de investigación de Genética dirigido por el Prof. Rafael Lozano. El mutante *afs1* procede de una colección de líneas T-DNA de tomate cv Moneymaker generadas mediante transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción genética de mutagénesis insercional pD991 (Campisi et al., 1999; Pineda et al., 2012). Por ello, se procedió a investigar el nº de insertos T-DNA que contenía en su genoma mediante un análisis por Southern Blot.

Dicho análisis se llevó a cabo con un pool de hojas de plantas TG1 utilizándose como sonda la secuencia codificante del gen marcador de selección que confiere resistencia al antibiótico Kanamicina *nptII*. Además, también se usó como control del Southern Blot una sonda con la secuencia que codifica para el gen endógeno *FALSIFLORA* (*FA*), del cual sólo se encuentra una copia en el genoma del tomate (Molinero-Rosales et al., 1999). Los resultados del análisis Southern Blot muestran que *afs1* cuenta con dos insertos incorporados en su genoma, detectados en la digestión con *HindIII* del gDNA, si bien la señal de uno de ellos es muy débil (**figura 24A**).

El siguiente paso consistió en clonar las regiones del genoma de *afs1* que flanquean a los insertos de T-DNA. Para ello se usó la técnica Anchor-PCR, que permite el clonaje de las regiones genómicas flanqueantes al inserto de T-DNA por sus extremos derecho e izquierdo, denominados Right Border (RB) y Left Border (LB) respectivamente (Schupp et al., 1999, Gidoni et al., 2003). Los resultados

obtenidos al aplicar dicha estrategia aguas arriba del inserto (por LB) dieron lugar al clonaje de secuencias correspondientes al cuerpo del vector, mientras que cuando se llevó a cabo aguas abajo del inserto (por RB) dieron lugar a una secuencia que correspondía al cuerpo del vector pero también a otra secuencia correspondiente una región del genoma localizada en el cromosoma 2.

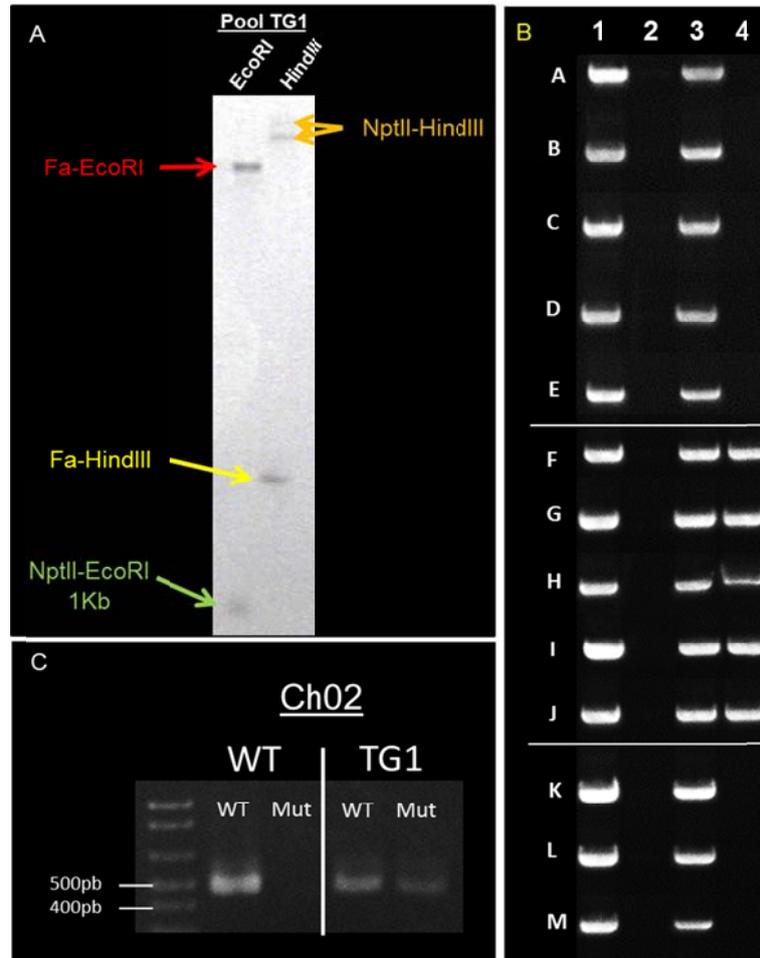


Figura 24. Análisis molecular del mutante *afs1*. (A) Resultados del análisis Southern Blot de material TG1 donde se detecta la presencia de dos insertos de T-DNA (usando como sonda de detección del inserto la secuencia *nptII* y como control de la técnica una sonda con la secuencia *FA*). (B) Resultados de PCR de gDNA obtenidos en: **1**=control (construcción completa de transformación), **2**=control (gDNA WT), **3**=gDNA línea TG1, y **4**=control (solo cassette T-DNA), utilizando una serie de cebadores (**tabla 14**) que cubren la construcción de transformación (vector pD991 + cassette de T-DNA) que muestran que, junto con los resultados obtenidos por Southern Blot, *afs1* contiene en su genoma dos insertos de T-DNA en tándem junto con el cuerpo del vector. (C) Genotipado por PCR con cebadores específicos (ver **tabla 13**) para detectar la presencia del alelo mutante con el inserto T-DNA en una población TG1; los tamaños de los amplicones para el alelo WT y el alelo *afs1* son 533 pb y 466 pb respectivamente.

Los resultados del Anchor-PCR indican que el evento de transformación en *afs1* ha dado lugar a la inserción en tándem de dos insertos T-DNA junto con el cuerpo del vector, por lo que al menos una copia *nptII* de los cassettes de T-DNA debe estar intacto y potencialmente debe ser funcional. El análisis por PCR con cebadores específicos que cubren todo el cassette de T-DNA y parcialmente el cuerpo del vector señala que todo el conjunto se ha insertado en el mutante como una sola construcción que posiblemente se herede como un solo inserto T-DNA (**figura 24B**)

Posteriormente se llevó a cabo un genotipado en TG1 con cebadores específicamente diseñados donde se comprobó la presencia del alelo mutante junto con el de WT (**figura 24C**).

El resultado del Anchor-PCR indica que todo este conjunto se ha insertado en un locus del cromosoma 2, a una distancia de 1,2 Kb de una secuencia codificante correspondiente al unigen SGN-U570174, que se corresponde a su vez con el modelo genético Solyc02g063360.2, pudiendo afectar a la región promotora del gen (**figura 25**). El análisis por BLASTX para la secuencia Solyc02g063360.2 resultó en la identificación con un alto grado de similitud de una proteína con dominio C2 Calcium/Lipid-binding (CaLBP) (**figura 26**).

El dominio C2 presente en la proteína codificada por el gen correspondiente a unigen SGN-U570174 es un dominio proteico ligado a membrana dependiente de dianas de Ca^{2+} que se encuentra en muchas proteínas que participan en los mecanismos de transducción de señales a nivel intercelular o intracelular localizadas en membranas celulares. Estos dominios son los únicos que muestran selectividad para la amplia gama de lípidos que componen las membranas celulares (Tiwari and Paliyath, 2011).

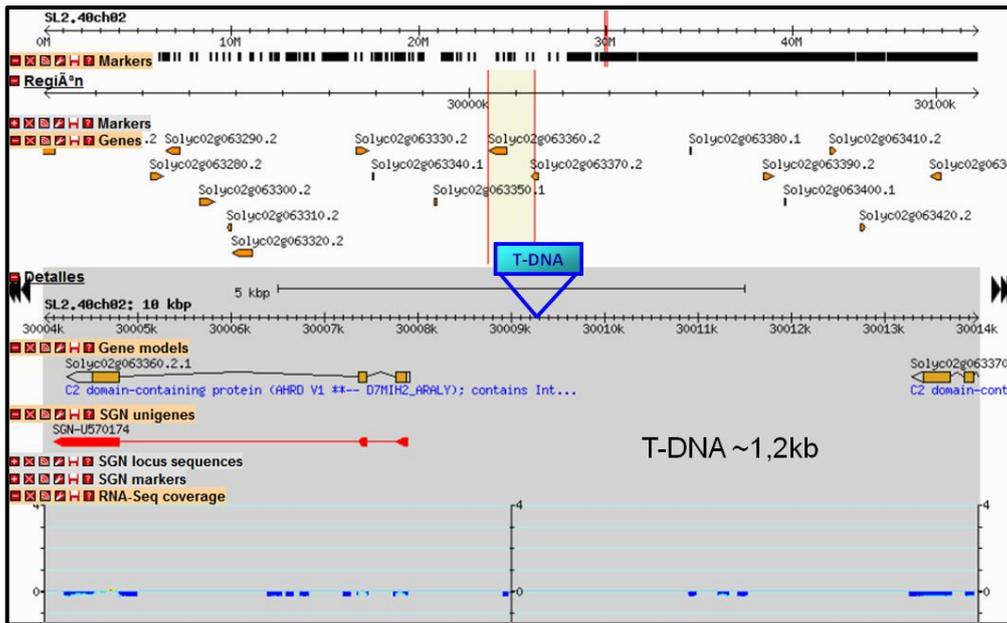


Figura 25. Localización genómica de la inserción de T-DNA localizada en el plantas TG1 del mutante *afs1*.

Annotations (manual: 0 | blast: 2 | go: 0)

Manual annotations
None manual annotation was found for this unigene

Blast Annotations [Show All]

Database	Program	Best Match	Score	E-value	Identity	Alignment Length	Frame
genbank	blastx	gi 147805778 emb CAN69475.1	243	2e-62	71.69	498 bp (52.8%)	2
Description: hypothetical protein [Vitis vinifera] >gi270226848 emb CBI15582.1 unnamed protein product [Vit&hellip]							
arabidopsis	blastx	At5G37740.1	220	1e-57	63.69	498 bp (52.8%)	2
Description: C2 domain-containing protein chr5:15009378-15010661 FORWARD							
swissprot	blastx	No significant hits (or none blast was used over this dataset)					

Figura 26. Resultados de BLASTX para el unigene SGN-U570174.

1.4. El análisis de cosegregación genotipo-fenotipo revela que la inserción T-DNA detectada en el genoma de *afs1* no es la causante de la mutación responsable del fenotipo

La siguiente etapa consistió en comprobar la cosegregación entre el fenotipo mutante y la presencia del inserto en *afs1* en una población segregante TG2 de 22 individuos. Para ello se utilizó un juego de cebadores específicos (**tabla 18**) para la detección por PCR de gDNA del alelo WT y del alelo con inserto T-DNA. También

se llevó a cabo un análisis de la presencia de *nptII* funcional mediante un test de sensibilidad a Kan de dichas plantas. El fenotipado de la población se basó en la partenocarpia de fruto (semillas/fruto) y en el cuaje temprano de fruto (fenotipo flor) (**tabla 18**). El análisis muestra que no hay cosegregación del fenotipo mutante con la presencia del inserto T-DNA, pues tal como se indica en la tabla hay un individuo (planta nº 15 en fondo amarillo) con fenotipo *afs1* pero sensible a Kan, indicando ausencia de *nptII* funcional, y donde el alelo mutante está ausente (acigota). Asimismo, también hay un individuo con fenotipo WT homocigoto para el inserto T-DNA (planta nº 14 con fondo azul). En este análisis de cosegregación, usando los cebadores específicos diseñados para la amplificación por PCR del inserto T-DNA y cuerpo del vector (**ver tabla 18**), también se comprobó que el alelo con el T-DNA siempre cosegrega con el cuerpo del vector (datos no mostrados), indicando que el conjunto de los T-DNA y el cuerpo del vector detectado por Anchor-PCR en las plantas TG1 *afs1* se hereda como un inserto.

1.5. Selección de una línea homocigota para el fenotipo de interés y acigota para el inserto de T-DNA para la caracterización de *afs1*

Tras descartar la inserción de la construcción T-DNA como causante del fenotipo mutante, se considera la posibilidad de que la mutación presente en la línea *afs1* sea debida a una variación somaclonal causada por la transformación vegetal y el cultivo *in vitro*. Esta ampliamente reconocido que existen eventos que ocasionan alteraciones en el genoma, denominadas variaciones somaclonales, debida a la manipulación, multiplicación y regeneración de materiales vegetales por medio del uso de técnicas de cultivo *in vitro*, pudiendo variar ampliamente la tasa de variación somaclonal en plantas regeneradas *in vitro* (Bairu et al., 2011). Muchas de estas modificaciones genéticas se manifiestan como mutaciones heredables en las progenies de las plantas regeneradas (Larkin and Scowcroft, 1981; Wang and Wang, 2012).

Tabla 18. Análisis de cosegregación fenotipo-genotipo en una población TG2 del mutante *afs1*. Acigota: ausencia de T-DNA; Hemicigota: presencia de alelo WT y alelo con T-DNA; Homocigota, el T-DNA está presente en los dos alelos. R, S, resistente y sensible al antibiótico Kanamicina, respectivamente.

Planta nº	Semillas/fruto	Fenotipo flor	Genotipado	Test Kan
1	2,9	WT	Hemicigota	R
2	0	Mutante	Hemicigota	R
3	58,04	WT	Acigota	S
4	94,57	WT	Acigota	S
5	79,33	WT	Acigota	S
6	59,17	WT	Acigota	S
7	53,62	WT	Acigota	S
8	75,43	WT	Acigota	S
9	7,38	WT	Hemicigota	R
10	47,8	WT	Acigota	S
11	37,53	WT	Acigota	S
12	0	Mutante	Homocigota	R
13	0	Mutante	Homocigota	R
14	4,14	WT	Homocigota	R
15	0	Mutante	Acigota	S
16	17	WT	Acigota	S
17	14,29	WT	Hemicigota	R
18	39,05	WT	Acigota	S
19	53,47	WT	Acigota	S
20	47,9	WT	Acigota	S
21	70,97	WT	Acigota	S
22	60,28	WT	Acigota	S

Para continuar con la caracterización fenotípica del mutante *afs1* se seleccionó una línea TG3 homocigota para el fenotipo y acigota para la presencia del T-DNA en su genoma. Debido a la ausencia total o casi total de semillas en los individuos con fenotipo, se consideraron tres opciones para poder obtener dicho material:

1. Se seleccionó un individuo TG3 con la características comentadas, en concreto el enumerado como 15 en la **tabla 18**, y se reintrodujo en cultivo *in vitro* de

forma axénica para poder optar a la multiplicación por yemas axilares y obtener réplicas clónales.

2. A partir de un individuo TG3 genotipado como acigoto para el T-DNA y con el fenotipo mutante se obtuvieron un total de 8 semillas. La progenie al completo presentó los rasgos fenotípicos característicos de *afs1*. Plantas de dicha progenie se reintrodujeron *in vitro* para poder multiplicarlas por yemas axilares y obtener réplicas clónales.
3. Se seleccionó un individuo TG4 con fenotipo *afs1* y sin T-DNA, del que se obtuvieron 27 semillas. También se comprobó la aparición del fenotipo mutante en toda su descendencia, que se reintrodujo *in vitro* con los mismos fines.

Con estas líneas *afs1* con las mismas características (con fenotipo mutante y acigotas para el T-DNA), se llevó a cabo la caracterización exhaustiva del mutante.

2. Caracterización fenotípica del mutante *afs1*

El análisis de cosegregación de la población TG2 de *afs1* nos permitió seleccionar líneas homocigotas para el fenotipo mutante y acigotas para el T-DNA con el fin de llevar a cabo su caracterización fenotípica. Algunos de los rasgos fenotípicos del mutante *afs1* que se van a presentar a continuación tienen gran interés agronómico como son el mayor crecimiento, la mayor tasa de cuaje de fruto y la partenocarpia. Como testigo en esta caracterización se utilizaron plantas de tomate del mismo genotipo (cv Moneymaker) que el utilizado en la mutagénesis insercional pero sin transformar (WT).

2.1. *afs1* presenta una mayor tasa de crecimiento vegetativo en nº de hojas y reproductivo en términos de nº de inflorescencias y de flores por inflorescencia

Como puede observarse en la **figura 27A** las plantas *afs1* presentan una mayor tasa de crecimiento con diferencias manifiestas en la altura de las mismas con respecto a WT. Otra de las características del fenotipo presente en *afs1* es que presenta flores más grandes que WT (**figura 27B**) donde además, se observa como el cono

estaminal queda reventado en su base por el crecimiento del ovario sin que se produzca la senescencia del cono y pétalos. Los frutos *afs1* presentan pétalos y restos del cono estaminal adheridos (figura 27C).

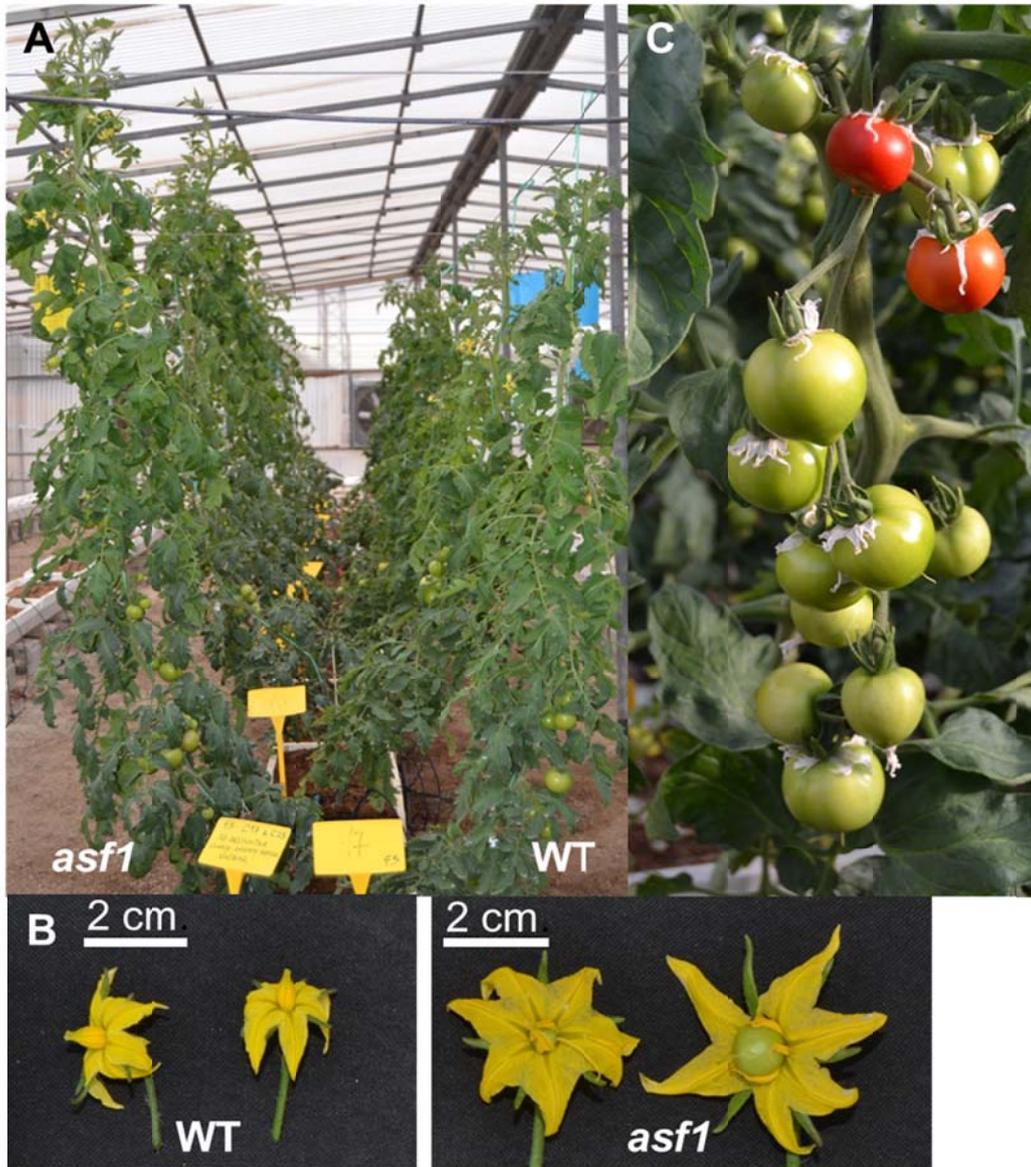


Figura 27. Principales rasgos fenotípicos de la línea *afs1*. (A) Vista general de plantas de la línea *afs1* (izquierda) y plantas WT (derecha) en invernadero. Se puede observar la mayor altura de *afs1* comparado con WT. (B) Comparación entre flores WT y *afs1* donde se puede observar el inicio del cuajado del fruto sin que tengan lugar la senescencia y abscisión de los pétalos y el cono estaminal. (C) Aspecto típico de un racimo de frutos *afs1* que se caracteriza por mantener los pétalos adheridos a su superficie, incluso en frutos maduros.

Se realizó un fenotipado exhaustivo de la tasa de crecimiento vegetativo y reproductivo del mutante mediante la determinación de:

1. El promedio del número de hojas por planta
2. El promedio del número de inflorescencias por planta
3. El promedio del número de órganos florales, recuento que engloba flores en todos los estadios de desarrollo de las inflorescencias, desde botón floral a flor en antesis.
4. La tasa de cuaje de fruto determinando el número de frutos cuajados desde su estadio más temprano (apreciación del engrosamiento del ovario) y se expresó como n° de frutos por planta, n° de frutos por n° de flores y n° de frutos por inflorescencias.

Este fenotipado se llevó a cabo en 3 campañas independientes en condiciones de invernadero con al menos cinco individuos *afs1* y cinco WT. Las poblaciones evaluadas se cultivaron durante 6-8 semanas en condiciones de cámara tras aclimatación *in vivo* para su posterior traslado y aclimatación en invernadero. Los muestreos se realizaron a 10, 12, 14, 16 y 18 semanas de estado de desarrollo. Los datos obtenidos para las diferentes variables analizadas indican claramente que *afs1* presenta una mayor tasa de crecimiento que WT, tanto vegetativo en términos de número de hojas por planta (**figura 28A**), como reproductivo en términos de número de inflorescencias (**figura 28B**), número de órganos florales (**figura 28C**), por planta en ambos casos, y finalmente tasa de cuaje relativo al número de flores (**figura 28D**) y por planta (**figura 28E**).

Los resultados de las **figuras 28D y 28E** demuestran que efectivamente la tasa de cuaje de *afs1* es superior a WT con independencia de que hay un mayor número de flores en el mutante comparando con WT (**figura 28C**).

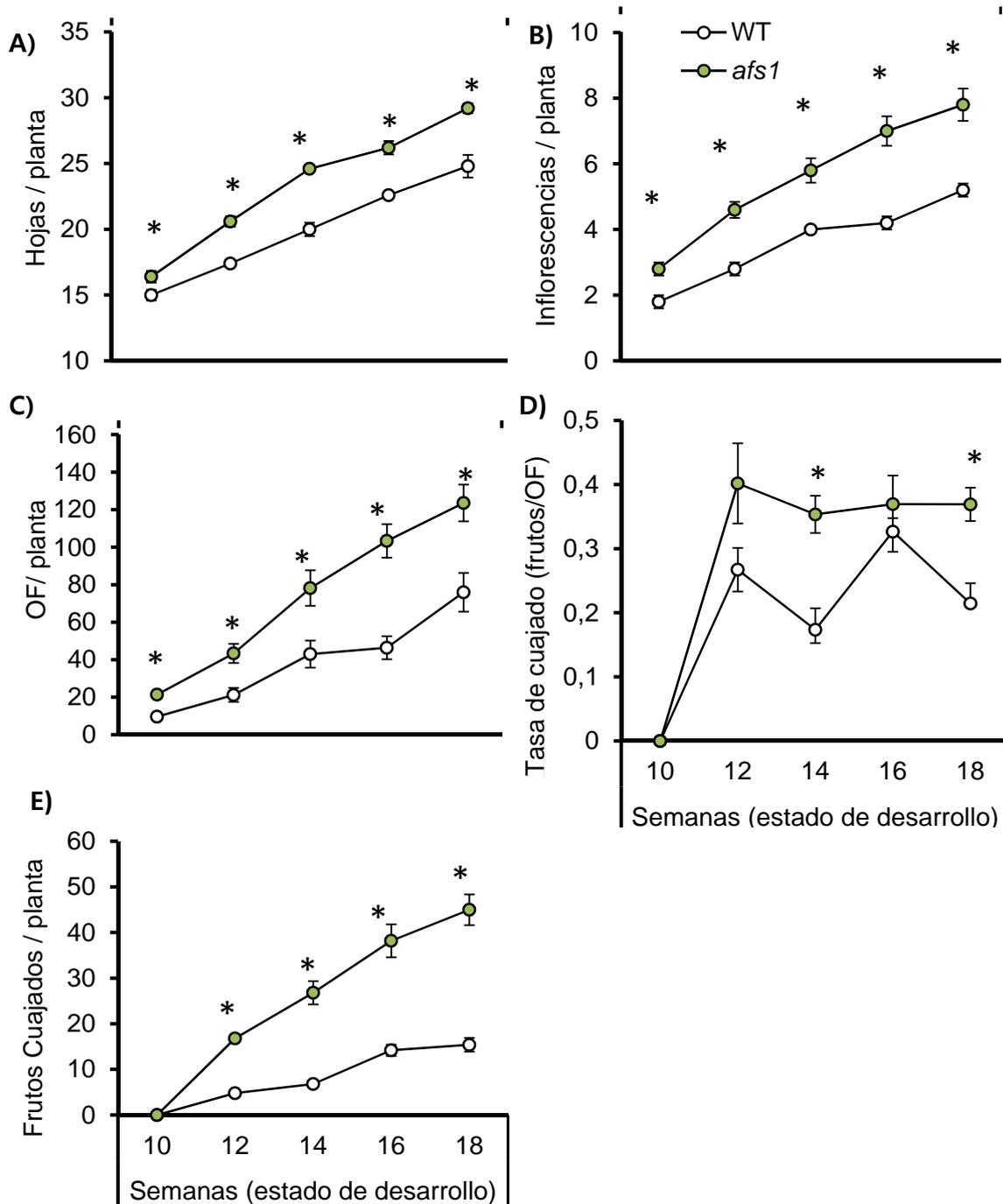


Figura 28. Evolución temporal del nº de hojas por planta (A); del nº de inflorescencias por planta (B); del número promedio de órganos florales por planta (C); tasa de cuaje expresado en nº de frutos por nº de órganos florales (D) y número promedio de frutos cuajados por planta (E). OF, Órganos florales. El fenotipado exhaustivo se llevó a cabo en 3 experiencias independientes para 5 plantas por genotipo. Tras corroborarse las diferencias en las experiencias independientes se muestran los datos recogidos para una campaña. Se representan los valores como medias \pm ES (error estándar). El asterisco indica diferencias significativas en las medias entre *afs1* y WT (test *t* de Student) para $p < 0,05$ para cada muestreo.

2.2. La producción de fruto aumenta de manera manifiesta en las inflorescencias *afs1*, dando lugar a frutos de menor tamaño y partenocárpicos

Se llevó a cabo un seguimiento de la producción de *afs1* en 3 campañas independientes de invernadero cuyos resultados se muestran en la **figura 29**. Se observó que el número total de frutos por planta fue significativamente mayor en *afs1* WT (**figura 29A**), mientras que el peso promedio de los frutos fue significativamente menor (**figura 29B**). El análisis de la producción inflorescencia a inflorescencia muestra que el peso promedio de los frutos en *afs1* es marcadamente inferior desde la primera inflorescencia (la más basal) (**figura 30B**) mientras que el incremento en el número de frutos por inflorescencia de *afs1* con respecto a WT sólo ocurre en estadios tardíos del desarrollo, haciéndose patente a partir de las inflorescencias más altas (inflorescencias 5ª y 6ª) (**figura 30A**).

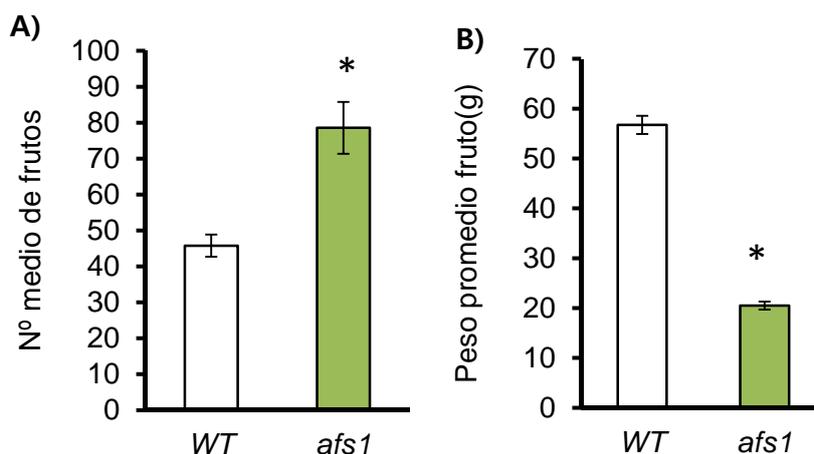


Figura 29. Análisis de la producción en la línea *afs1* con respecto a WT: número de frutos obtenidos (A) y el peso promedio del fruto (B). Los datos representan la media \pm el error estándar de los datos para cada muestra (n=5 plantas). Tras corroborarse las diferencias en 3 experiencias independientes, se muestran los datos recogidos para una campaña. El asterisco indica las diferencias significativas entre las medias para $p < 0,05$ respectivamente del mutante *afs1* en comparación con WT.

Los datos obtenidos del peso total de frutos por planta muestran una mayor producción para la línea *afs1* (**figura 31**) a pesar de que los frutos del mutante presenten un menor peso promedio por fruto que WT (**figura 30B**). La mayor tasa

de cuaje de fruto y por tanto el mayor número de frutos que produce *afs1* se superpone al efecto del descenso de tamaño de los frutos del mutante al calcular la producción total.

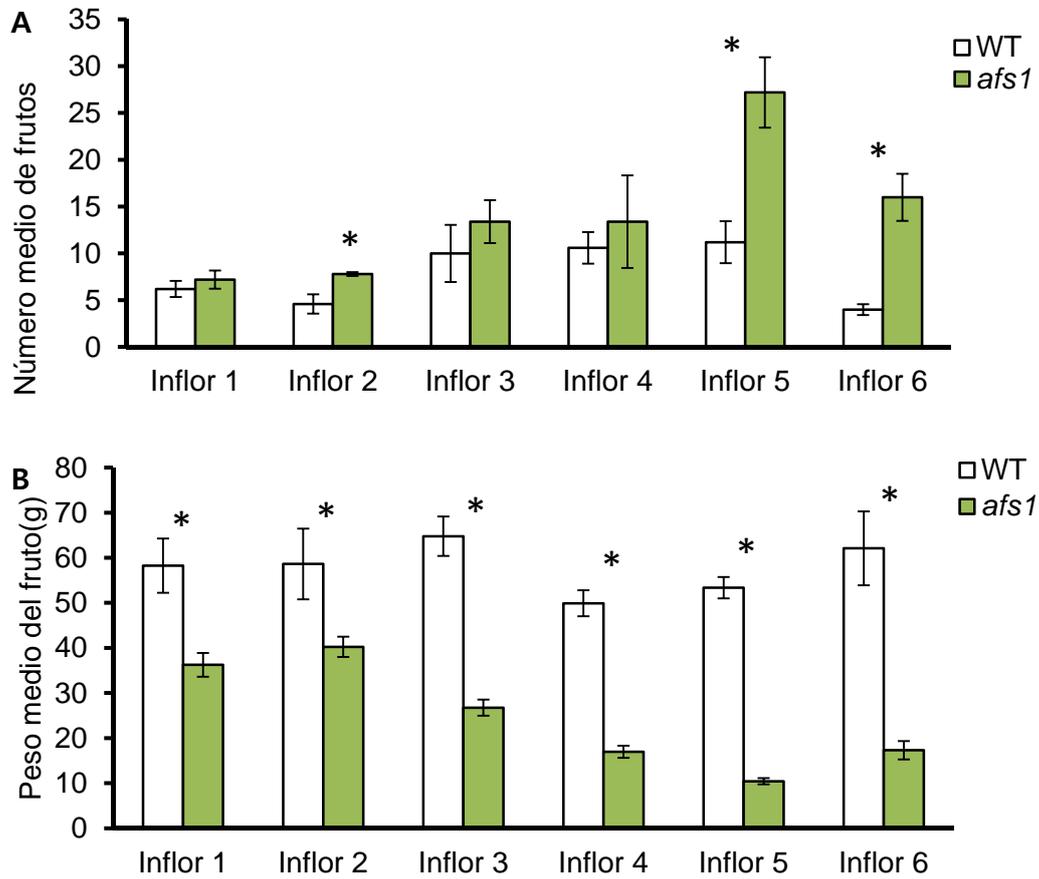


Figura 30. Análisis de la producción por inflorescencia en la línea *afs1* con respecto a WT: número de frutos total (A) y peso promedio del fruto (B). Las inflorescencias (Inflor) se enumeran en orden creciente desde la base hasta el ápice. Los datos representan la media \pm el error estándar de los datos para cada muestra (n=5 plantas). Tras corroborarse las diferencias en 3 experiencias independientes, se muestran los datos recogidos para una campaña. El asterisco indica diferencias significativas entre las medias para $p < 0,05$ del mutante *afs1* en comparación con WT.

En conclusion, *afs1* mostró un mayor rendimiento (tanto en kilogramos de tomates como en nº de frutos de tomate cosechados por planta) que WT, a pesar de las diferencias existentes en cuanto a tamaño de fruto en el mutante con respecto a su testigo WT.

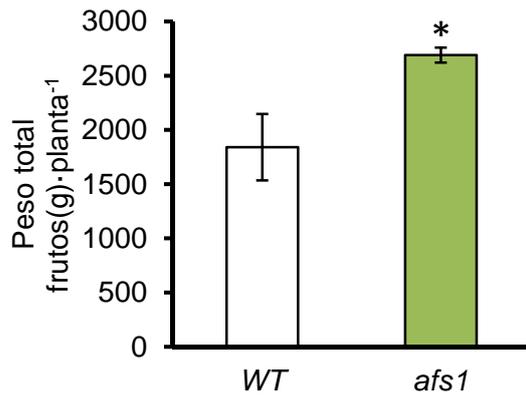


Figura 31. Análisis de la producción: Peso total de los frutos recolectados por planta. Los datos representan la media \pm ES (error estándar) de los datos para cada muestra (n=5 plantas). Tras corroborarse las diferencias en 3 experiencias independientes, se muestran los datos recogidos para una campaña. El asterisco indica las diferencias significativas entre las medias para $p < 0,05$ del mutante *afs1* en comparación con WT.

Otro aspecto analizado en los frutos fue la producción de semillas y para ello se recolectaron y contabilizaron los frutos de ambas líneas, se extrajeron las semillas fruto a fruto y se contabilizaron. El fruto de *afs1* no contenía semillas salvo en muy contadas excepciones (3,19 semillas/fruto), mientras que la media de semillas por fruto WT fue de 102,6 (**figura 32A**). Lo que se apreció al examinar el interior de los frutos *afs1* fue la presencia de primordios seminales que no habían avanzado en su desarrollo para dar lugar a semillas verdaderas salvo excepcionalmente, todo lo contrario a lo que ocurre en WT (**figura 32B**).

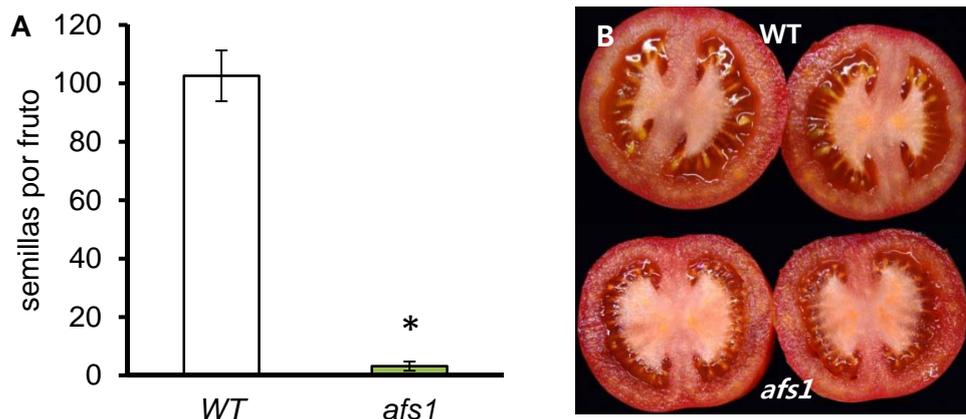


Figura 32. Análisis de la producción: Recuento de semillas por fruto. (A) Los datos representan la media \pm ES (error estándar) de los datos para cada muestra (n=5 plantas). Tras corroborarse las diferencias en 3 experiencias independientes, se muestran los datos recogidos para una campaña. * indica las diferencias significativas entre las medias para $p < 0,05$ del mutante *afs1* en comparación con WT. (B) Aspecto del interior de los frutos *afs1* y WT cortados transversalmente.

2.3. El cuajado de fruto partenocárpico en *afs1* ocurre de forma independiente de la polinización

Con el fin de averiguar si el cuaje de fruto partenocárpico en *afs1* es dependiente o no de polinización se han realizado operaciones de emasculación de flores mutantes y de polinización manual con polen de su genotipo (autopolinización) y polinización cruzada (retrocruce). Como control de estas operaciones, se sometieron flores WT a las mismas manipulaciones y se hizo un seguimiento de su evolución. Además, se añadió otro control más que consistió en el recuento de las semillas de frutos cuajados procedentes de flores no manipuladas, tanto WT como *afs1*. Con respecto a este último tipo de control, que constó de 8 frutos WT y 8 frutos mutantes procedentes de flores no manipuladas, se recolectaron semillas solamente en el primer caso (74 semillas/fruto) mientras que ningún fruto *afs1* contenía semillas (**tabla 19**).

Tabla 19. Resultados de nº de frutos cuajados y de semillas en las operaciones de (A) emasculación; (B) autopolinización (*afs1* y WT), y (C) retrocruce *afs1* × WT.

A)					
Emasculación línea		Flores emasculadas	Frutos cuajados	Frutos con semillas	Semillas totales
WT		38	10	0	0
<i>afs1</i>		26	22	0	0

B)					
Polen (♂)	Ovario (♀)	Cruces realizados	Frutos cuajados	Frutos con semillas	Semillas totales
WT	WT	40	6	3	47
<i>afs1</i>	<i>afs1</i>	18	17	2	1

C)					
Polen (♂)	Ovario (♀)	Cruces realizados	Frutos cuajados	Frutos con semillas	Semillas totales
WT	<i>afs1</i>	23	16	2	10
<i>afs1</i>	WT	47	3	1	31

Semillas recolectadas en frutos sin manipulación: WT=74 semillas/fruto (n=8); *afs1*=0 semillas/fruto (n=8)

Se puede observar en la **tabla 19A** que del total de 26 flores emasculadas *afs1*, 22 de ellas dieron lugar a la formación de fruto, ninguno de ellos con semillas, resultando una tasa de cuaje de un 85%. Es interesante destacar que la misma operación llevada a cabo con flores WT ha dado lugar también a frutos, todos ellos sin semillas, si bien en una proporción mucho menor que en *afs1* (26% vs 84%) (**tabla 19A**). Cuando se realizó la polinización manual de flores *afs1* con su propio polen, el porcentaje de cuaje de fruto fue superior que para el caso de flores emasculadas (94% vs 84%), pero también todos los frutos obtenidos resultaron ser sin semillas salvo una excepción (**tabla 19B**). El porcentaje de cuaje de fruto en flores WT polinizadas a mano fue ciertamente bajo (25%) y la mitad de los frutos que se obtuvieron contenían semillas (**tabla 19B**). Estos resultados indican que, con independencia de que tenga lugar o no polinización las flores *afs1* terminan cuajando en fruto partenocárpico con una elevada frecuencia.

Los datos anteriores indican que incluso la polinización manual de *afs1* da lugar a frutos partenocárpico (salvo excepciones). Para investigar si la partenocarpia en *afs1* se debe a la parte masculina, a la femenina, o bien participan ambos en dicho proceso se llevó a cabo un experimento de polinización cruzada manual con WT (retrocruce) en los dos sentidos (**tabla 19C**). La polinización de ovarios *afs1* con polen WT resultó en una tasa de cuaje muy notable (68%) pero la gran mayoría de los frutos obtenidos no contienen semillas. Cuando se polinizan ovarios WT con polen *afs1* la tasa de cuaje de fruto resultó en cambio muy baja (6%) y sólo uno de los frutos obtenidos contenía semillas (**tabla 19C**). Del análisis de los resultados de estas operaciones se deduce que el cuajado es independiente de la polinización en *afs1* y que tanto el androceo como el gineceo del mutante participan de la partenocarpia.

A continuación, se evaluó la densidad y la viabilidad del polen en ambos genotipos con objeto de evaluar la capacidad de polinización del polen *afs1*. Se llevó a cabo en 4 experimentos independientes, siguiendo el protocolo descrito por Li et al. (2004). De un total de 5 plantas por genotipo se extrajo polen de 15 flores y se hizo el recuento para 10 campos ópticos elegidos arbitrariamente (microscopio óptico, aumentos: 100X) para cada experiencia (**figura 33**).

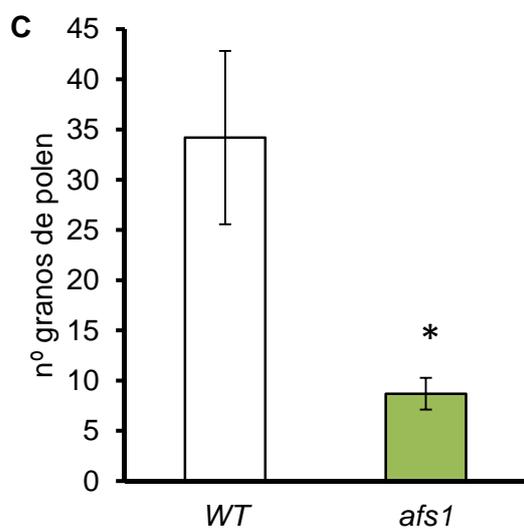
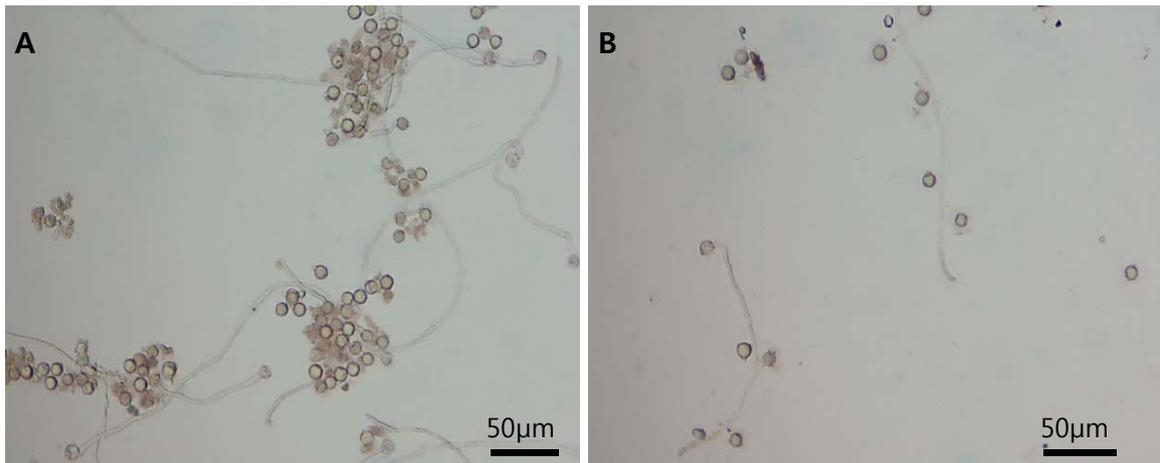


Figura 33. Evaluación de la densidad y viabilidad del polen. Imágenes de granos de polen WT (A) y *afs1* (B). (C) Los datos del recuento representan el promedio \pm ES (error estándar) de los datos para cada muestra (n=5 individuos). Tras corroborarse las diferencias en 3 experiencias independientes, se muestran los datos recogidos para una campaña. * indica las diferencias significativas entre las medias para $p < 0,01$ del mutante *afs1* en comparación con WT.

Los resultados obtenidos en la cuantificación (**figura 33C**) muestran una drástica reducción del contenido de polen en la flor *afs1* con respecto a WT. Los resultados de tasa de viabilidad de los granos de polen (expresada como porcentaje de granos que forman tubo polínico con respecto al total) para WT fueron ciertamente más bajos de lo esperado (20%) pero *afs1* presentó un porcentaje aún más reducido (12%). Tan baja densidad y viabilidad del polen se pueden apreciar visualmente en las micrografías (**figura 33A y B**). Estos resultados del estudio del polen indican que la flor *afs1* produce mucho menos polen que WT y que además, su viabilidad determinada por su capacidad de formación de tubo polínico es notablemente más baja, lo que explicaría su manifiesta menor capacidad de polinización.

2.4. La partenocarpia en *afs1* no se debe a malformaciones en la estructura de la flor

A continuación, se realiza un estudio morfológico de la flor del mutante *afs1*, poniendo especial énfasis en el análisis de la estructura y tamaño del pistilo, con el fin de detectar posibles alteraciones morfológicas que explicaran la responsabilidad del gineceo del mutante en la generación de frutos partenocárpico.

Respecto a la morfología de la flor completa, las plantas de la línea mutante mostraron características idénticas a las encontradas en WT desarrollando, de forma aparentemente normal, los 4 verticilos típicos de la flor, que dan lugar respectivamente, a los seis sépalos, los seis pétalos y los seis estambres fusionados formando el cono estaminal característico de tomate que rodea al pistilo, que forma el cuarto verticilo (**figura 34**).

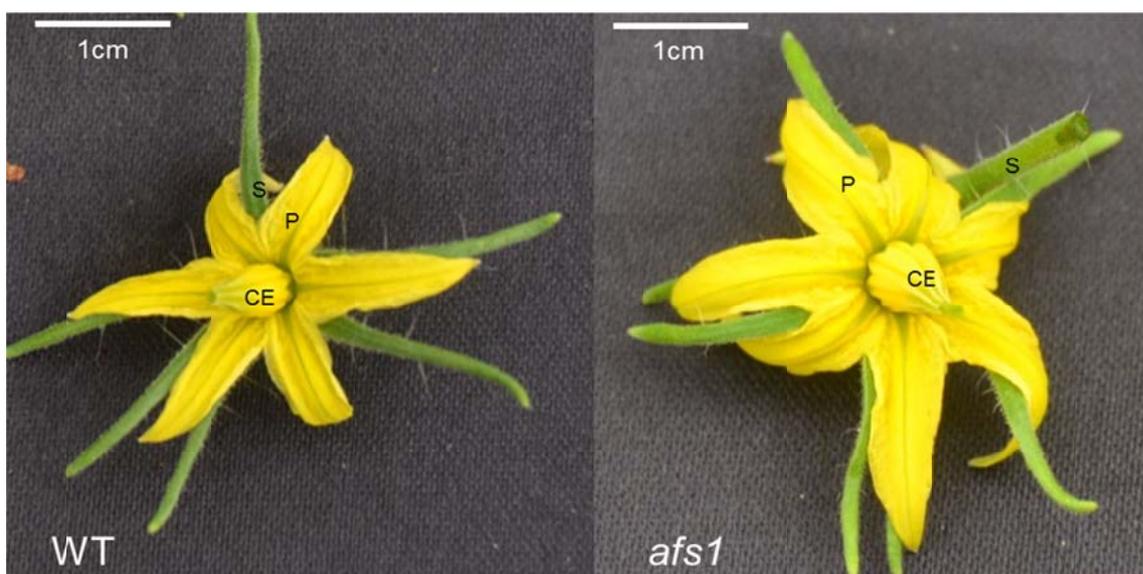


Figura 34. Flor WT y *afs1* indicando sus diferentes partes anatómicas. Aunque estructuralmente son iguales, en el genotipo *afs1* las flores presentan un mayor tamaño. S, sépalos; P, pétalos, y CE, cono estaminal (el pistilo se encuentra rodeado por esta estructura).

En el examen realizado de la flor en anthesis no aparecen alteraciones en la organización de las anteras que impidan la formación del cono estaminal así como tampoco se observó la protusión del estigma por encima de la abertura del cono

estaminal (longistilia). Se observó que, de manera general, la flor mutante era de mayor tamaño que WT pero no revelaba alteraciones en la misma (**figura 34**).

Tras este primer análisis, se trató de identificar potenciales diferencias morfológicas a una escala más pequeña usando estéreo-microscopía en flores *afs1* y WT seccionadas sagitalmente (**figura 35**). Se comprobó la inexistencia de malformaciones estructurales como la alteración en la estructura de las anteras que impidan su correcto desarrollo, o la aparición de longistilia como hemos mencionado, donde el estigma sobresale del cono estaminal impidiendo la autopolinización, o malformaciones en la estructura del pistilo. En todos estos casos los frutos producidos presentan partenocarpia y se reconoce que estas alteraciones morfológicas están implicadas en la partenocarpia (**figura 35A**). Pero la única característica anatómicamente diferencial de la flor *afs1* con respecto a WT parece ser el manifiestamente mayor tamaño del ovario, que parece tener un reflejo en el mayor tamaño de la flor (**figura 35A y C**).

Se realizó un análisis microscópico de la morfología del ovario en el estado de antesis y para ello se marcaron flores en estadio de preantesis, específicamente a 4 días antes de antesis (4DAA) y seleccionaron ovarios *afs1* y WT en estado de antesis para realizar cortes transversales y llevar a cabo la evaluación de la estructura interna del ovario al microscopio óptico. No se observaron diferencias morfológicas entre *afs1* y WT en lo que respecta a la estructura del ovario (**figura 35B**). También se seleccionaron flores en el mismo estado de desarrollo (antesis), en las cuales se seccionaron y se extrajeron el gineceo completo para realizar medidas comparativas de la altura del estilo. Esto se llevó a cabo en 3 experiencias independientes para un total de 6 flores seleccionadas al azar en inflorescencias homólogas para ambos genotipos. Las imágenes y datos recogidos no muestran diferencias notables en cuanto a tamaño o longitud del estilo, lo cual indica que la partenocarpia de *afs1* no es debida a la formación de pistilos longistilos, mientras que si se observó el mayor engrosamiento del ovario con respecto a WT como ya hemos mencionado (**figura 35C**).

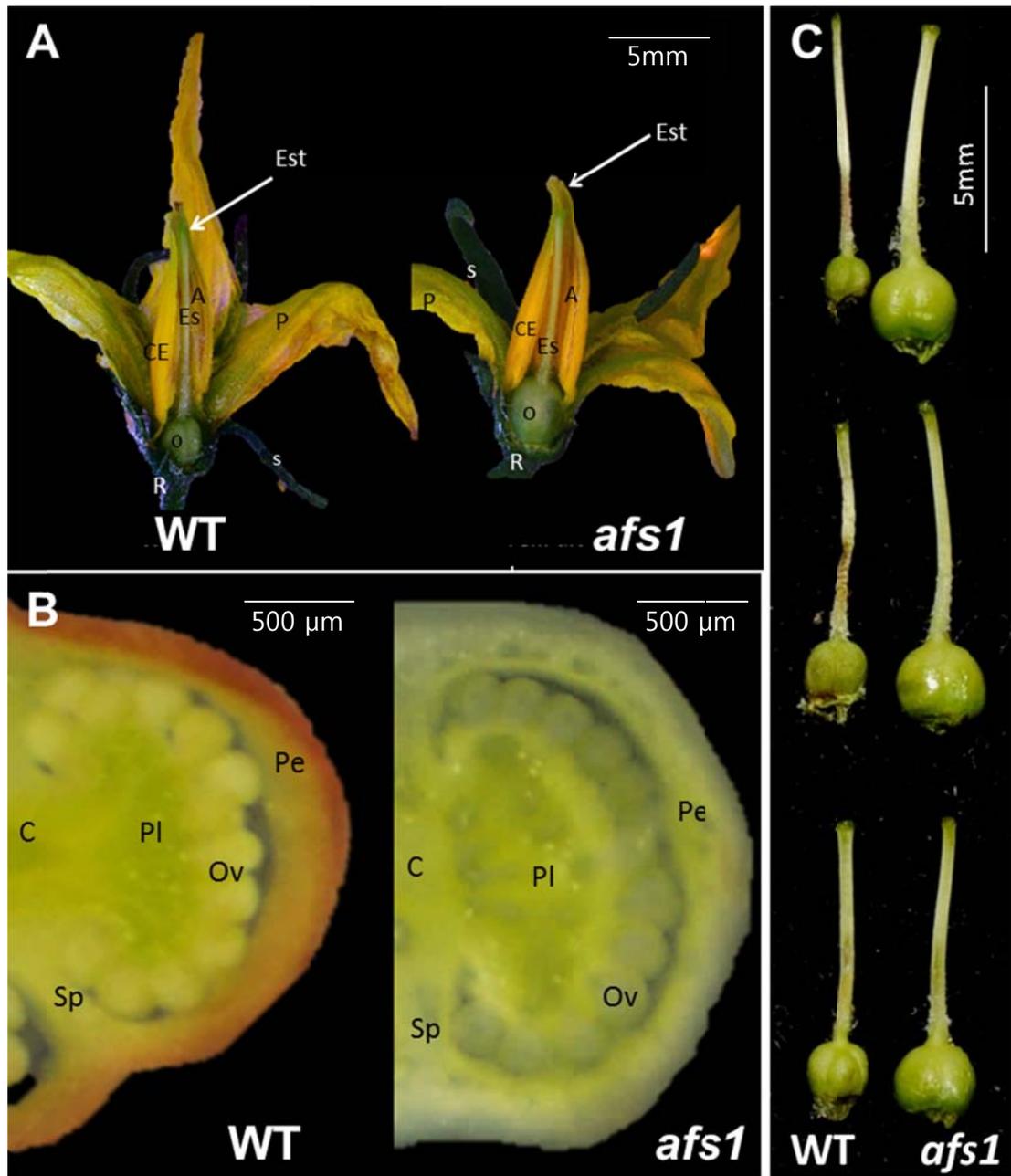


Figura 35. Análisis de la morfología y estructura de la flor *afs1* comparado con WT. (A) Observación bajo estéreo microscopio SMZ 1500 (aumento 7,5X) de flores de ambas líneas donde se observa el mayor tamaño del ovario *afs1* con respecto a WT, sin apreciarse malformaciones estructurales en el resto de la flor. (B) Secciones transversales de ovarios de flores en antesis de ambas líneas observadas al microscopio óptico (aumentos 100X) donde no se observan diferencias remarcables. (C) Comparación de las alturas de los pistilos *afs1* y WT de flores en el mismo estado de desarrollo. Al igual que en la figura A, se puede apreciar el mayor tamaño del ovario *afs1* usando estéreo microscopía (SMZ 1500 aumento 7,5X). **Est**, estigma; **Es**, estilo; **O**, ovario; **R**, receptáculo; **A**, antera; **CE**, cono estaminal; **P**, pétalo; **S**, sépalo; **C**, Columnela; **Sp**, Septo; **Pl**, Placenta; **Ov**, Óvulo; **Pe**, Pericarpio.

2.5. El desarrollo floral en *afs1* no está sincronizado y se caracteriza por un engrosamiento del ovario y un cuaje de fruto sin que se produzca la senescencia y abscisión de pétalos y cono estaminal de la flor.

Con el fin de detectar si durante el desarrollo de la flor existen diferencias entre *afs1* y WT, se efectuó un seguimiento cuidadoso de la evolución del desarrollo floral. Para llevar a cabo la correcta caracterización del desarrollo floral de la línea mutante, primero se caracterizó el desarrollo de la floración y fructificación en sus etapas iniciales para WT. Para el desarrollo floral se consideraron los siguientes estadios (para una escala temporal en WT):

- Yema floral temprana: corresponde a 6-5 días antes de antesis (DAA) (**figura 36.1**)
- Yema floral tardía: corresponde a 4-3 DAA (**figura 36.2**)
- Preantesis: corresponde a 2DAA (**figura 36.3**) y 1DAA (**figura 36.4**)
- Antesis: Día 0 (**figura 36.5**).
- Post-antesis sin fecundación (senescencia de la flor): corresponde a 2 después de antesis (DDA) (**figura 36.6**) y 4DDA (**figura 36.7**)
- Inicio de la fructificación: corresponde a 2DDA (**figura 36.8**)
- Etapa de división celular: corresponde a 10-14 DDA (**figuras 36.9 y 10**)
- Etapa de expansión celular hasta tamaño final del fruto: corresponde a 3-5 Semanas después de la antesis (**figuras 36.11 y 12**)

El estadio de antesis es aquel en el que la flor se encuentra completamente abierta y dispuesta para la fecundación, en este estadio el polen ha alcanzado su grado de desarrollo óptimo y es fértil, mientras que las flores consideradas en post-antesis son aquellas que no han sido fecundadas y no han dado cuaje de fruto, que terminan entrando en senescencia (**figura 36**).

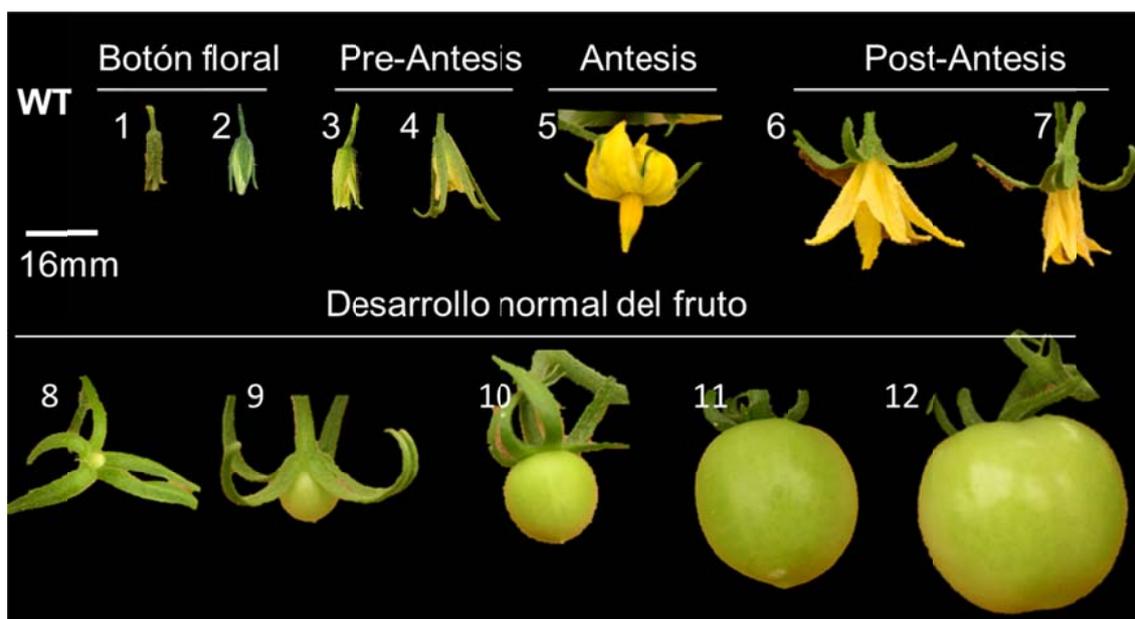


Figura 36. Evolución del desarrollo de la flor y del fruto en WT. Para el desarrollo de la flor se seleccionan 7 estadios mientras que para el fruto se seleccionaron 5 estadios del inicio de la fructificación (8-11). **1**, correspondiente a 6 Días Antes de antesis (DAA); **2**, 4 DAA; **3**, 2DAA; **4**, 1DAA; **5**, Antesis o día 0; **6**, 2 días después de antesis (DDA); **7**, 4DDA; **8**, Inicio de la fructificación; **9-10**, etapas de crecimiento caracterizado por la división celular; **11-12**, etapas de crecimiento caracterizado por la expansión celular antes del inicio de la maduración.

Con respecto a la evolución de las diferentes fases de desarrollo reproductivo en el mutante *afs1*, se observa que durante la fase correspondiente a la antesis tiene lugar un engrosamiento del ovario que indica que el cuaje de fruto está ocurriendo en la flor a pesar de la persistencia de los pétalos y el cono estaminal, provocando finalmente que el cono estaminal se abra por la base (**figura 37**). A medida que aumenta el tamaño del fruto, tanto el cono estaminal como los pétalos se desorganizan pero sin perder su adhesión al fruto que a medida que transcurre su desarrollo siguen permaneciendo adheridos a su superficie tanto los pétalos como restos del cono estaminal (**figura 37**).

Finalmente se llevó a cabo el seguimiento cronológico del desarrollo de la flor y del fruto cuajado de *afs1* comparándolo con el de WT (**figura 38**).

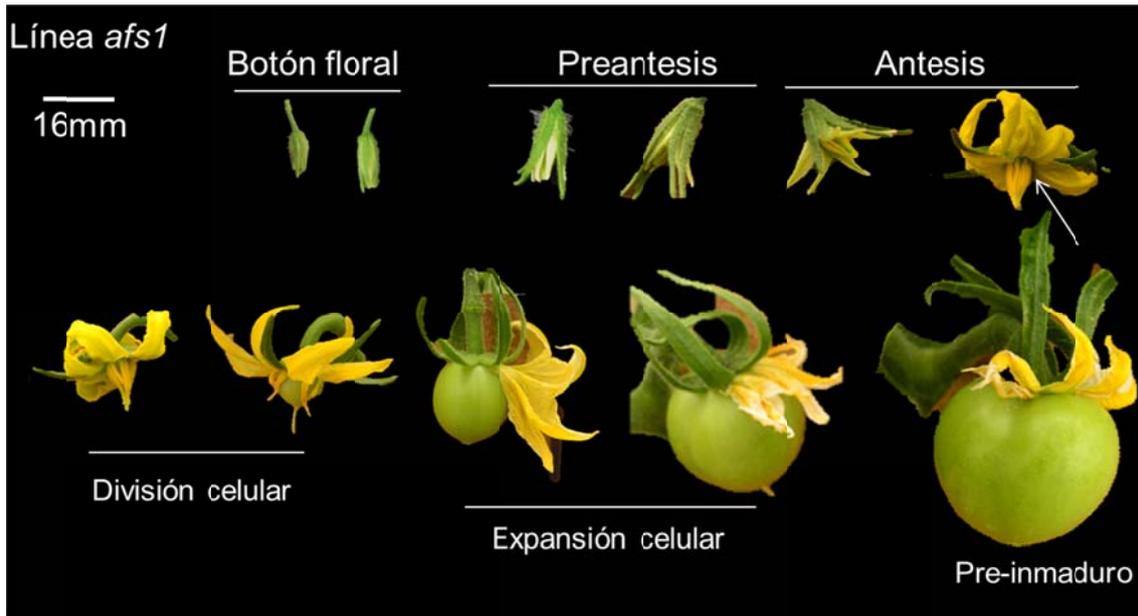


Figura 37. Evolución morfológica para los diferentes estadios reconocidos en el desarrollo de la flor y fruto en el mutante *afs1* hasta justo antes de la maduración.

Flores *afs1* y WT se etiquetaron en el estado de yema floral tardía (3DAA), considerado día 0 (D0, **figura 38A**) para el seguimiento. Esta experiencia se realizó con un número total de 15 flores marcadas por genotipo en una población de 5 plantas *afs1* y 5 plantas WT. Se siguió el desarrollo de la flor observándose que 3 días más tarde todas las flores WT etiquetadas se encuentran en estado de antesis (**figura 38B**). En cambio, tras dicho lapso de tiempo, las flores *afs1* se encontraban en muy diversos estadios de desarrollo; desde aquellas que aparentemente no habían evolucionado apenas desde el estadio de yema floral tardía (**figura 38H e I**) hasta aquellas que habían llegado a antesis (**figura 38D y E**) y otras que se encontraban en preantesis (**figura 38F y G**). Tras 14 días, las flores WT etiquetadas dieron lugar a fruto cuajado en estadio temprano de desarrollo (**figura 38C**), mientras que las flores *afs1* etiquetadas se encontraban, todas ellas, aparentemente en estadio de antesis, en algunos casos con el engrosamiento por la base del cono estaminal (**figura 38J, K, L**). Estos resultados muestran que en las flores *afs1* no existe una sincronización para el desarrollo floral del mismo modo que ocurre para WT. En particular, se aprecia un retraso en la senescencia de los pétalos y del cono estaminal, ya que tras 14 días del marcado persiste la flor *afs1* en estado de antesis.

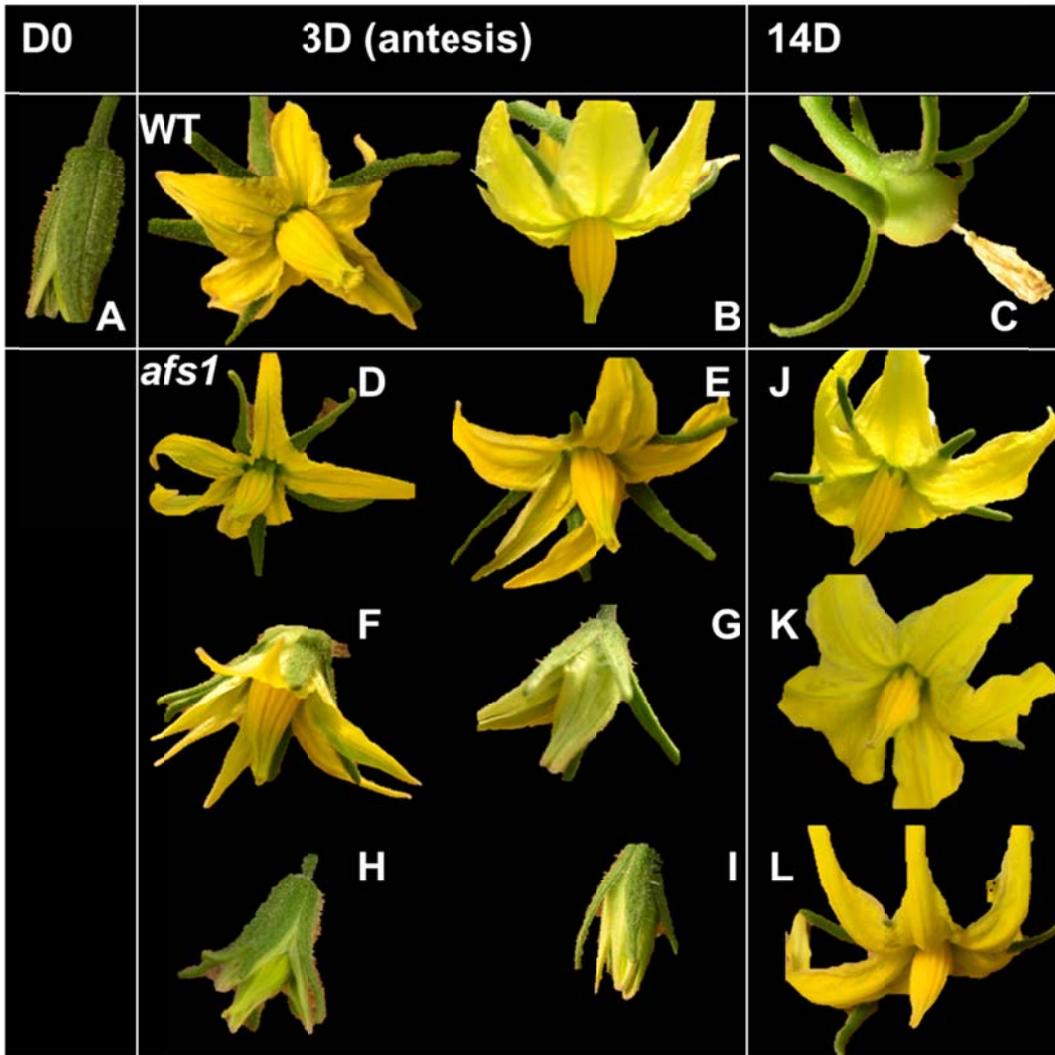


Figura 38. Análisis cronológico del desarrollo floral en *afs1* comparado con WT. Se muestran flores representativas de los estadios observados durante el análisis. Para el día 0 (D0) se seleccionaron flores en estado yema floral tardía, estado en el cual se seleccionaron todas las flores en inflorescencias homologas, en el mutante y en WT. A 3 días del etiquetado (3D) mientras que la situación fue homogénea para las flores del genotipo WT, en el mutante el estado de floración encontrado en el total de flores etiquetadas fue dispar. A 14 días del etiquetado WT se encontraba claramente en fase de crecimiento del fruto mientras que el estado de las flores *afs1* era de antesis y se podía observar el ovario engrosado en la base del cono estaminal indicando cuaje de fruto.

2.6. Los frutos *afs1* presentan un desarrollo similar a los frutos WT tratados con auxinas y giberelinas

Las giberelinas y las auxinas son las principales hormonas vegetales que participan en la regulación del cuajado del fruto (Mapelli et al., 1978; Fos et al., 2000; Fos et

al., 2001; Serrani et al., 2007). Es conocido que el tratamiento de flores con estas hormonas de forma exógena induce el cuaje de fruto y la producción de frutos partenocárpicos en distintas especies vegetales (Alabadi et al., 1996; Bungler-Kibler S, 1983). Con el fin de averiguar si el fruto *afs1* se asemeja morfológicamente a un fruto WT tratado con auxina o más bien a un fruto WT tratado con giberelinas se han llevado a cabo tratamiento con ácido giberélico (GA₃) o con ácido indolacético (IAA), giberelina y auxina bioactivas respectivamente, en flores WT emasculadas en estadio 4DAA.

Como control del experimento se trataron flores WT solo con el solvente utilizado para disolver las hormonas (tratamientos control). Aparte también se consideraron para este estudio frutos WT y *afs1* sin tratamiento, de cuaje espontáneo. Los resultados de estas operaciones, tanto del número de frutos obtenidos por n° de tratamientos como de formación de semillas en dichos frutos se muestran en la **tabla 20**.

		NTT	NF	FC(%)	FS	FS(%)	NTS
Sin tratamientos	WT	-	9	-	9	100	684
	<i>afs1</i>	-	9	-	0	0	0
Con tratamiento	GA₃	20	11	55	0	0	0
	IAA	22	12	54,55	0	0	0
	Control	20	4	20	0	0	0

Tabla 20. Cuajado y recolección de semillas para los tratamientos hormonales. Control (WT), selección directa de frutos maduros WT sin tratamiento hormonal (Control); ***afs1***, selección directa de frutos maduros *afs1* sin tratamiento hormonal; **GA₃**, flores WT tratadas con GA₃; **IAA**, flores WT tratadas con IAA; **Control Tto**, flores WT manipuladas de igual forma que las flores tratadas, sin adición de hormonas. **NTT**, Número Total de Tratamientos individuales (flor a flor) realizados; **NF**, Número de frutos recolectados; **FC(%)**, Porcentaje de frutos cuajados; **FS**, Frutos con semilla; **FS(%)**, Porcentaje de FS; **NTS**, Número Total de Semillas recolectadas.

Ciertamente, un pequeño porcentaje de flores WT tratados con solvente dio lugar a fruto, en todos los casos sin semillas. En el caso de los tratamientos

hormonales, aproximadamente la mitad de los tratamientos para cada tipo de hormonas dio lugar a fruto pero ninguno de ellos contenía semillas (**tabla 20**).

A continuación se llevó a cabo un estudio morfológico a nivel macroscópico de los frutos WT y *afs1* generados por cuaje sin tratamiento y de los frutos WT generados por tratamiento de flores con GA₃ e IAA, todos ellos en estadio de desarrollo verde inmaduro (**figura 39**). Los ovarios de flores WT sin tratamiento desarrollaron frutos con semillas unidos a la placenta expuestos hacia la cavidad locular y embebidos en mucilago (**figura 39 WT**) mientras los ovarios de flores WT tratados con GA₃ e IAA dieron frutos que salvo por la ausencia de semillas no presentaron grandes diferencias morfológicas comparadas con los primeros (**figura 39 WT+GA₃, WT+IAA**).

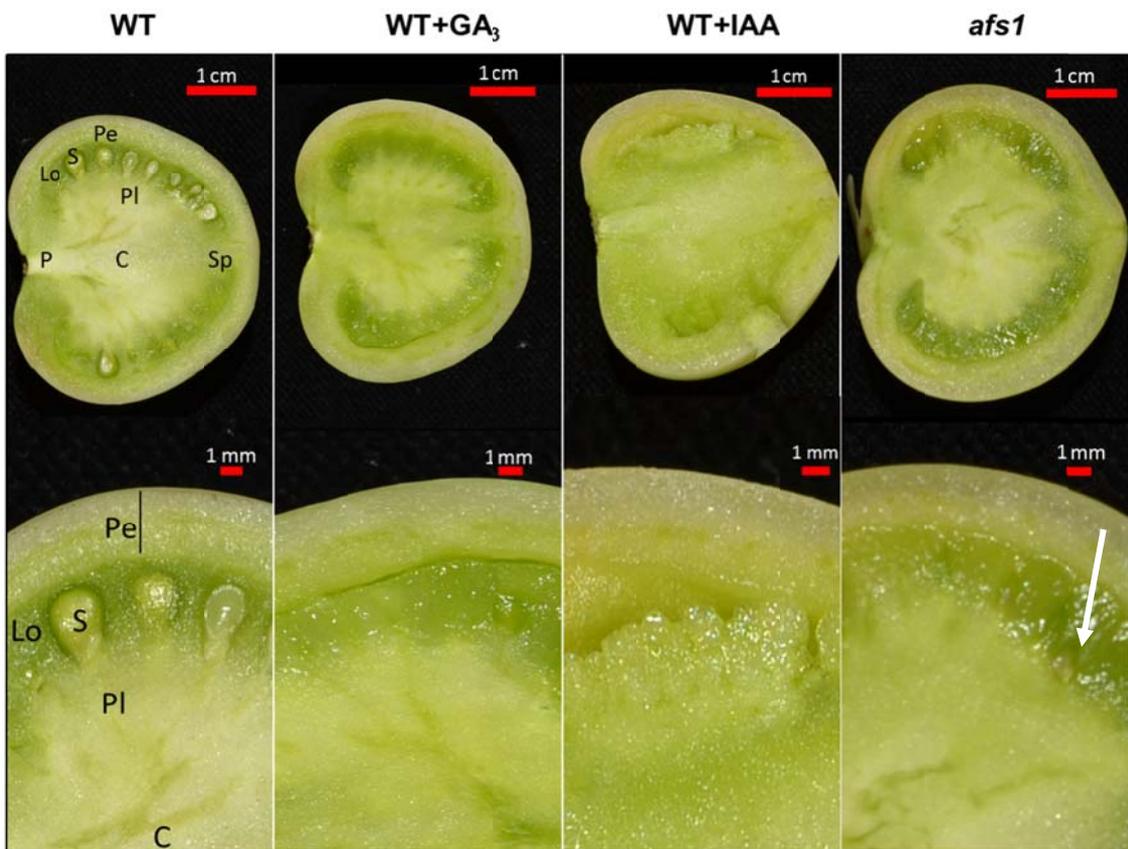


Figura 39. Comparación entre frutos en estado verde inmaduro procedentes de flores sometidas a tratamiento hormonal. WT, fruto de flor WT cuajado espontáneo; **WT+GA₃**, fruto de flor WT tratada con GA₃; **WT+IAA**, fruto de flor WT tratada con IAA; ***afs1*** fruto de flor mutante sin tratamiento. **Pe**, Pericarpio; **Lo**, Lóculo; **Pl**, placenta; **S**, semilla; **C**, columnela; **P**, pedúnculo; **Sp**, Septo.

Solamente se aprecia una disminución de mucilago en la cavidad locular en los frutos resultado del tratamiento de flores WT con IAA, en comparación con frutos WT sin tratar y producto del tratamiento con GA₃. Al comparar estos tipos de frutos WT con *afs1* se aprecia en estos últimos la aparente formación de primordios seminales que no se detectan en frutos WT resultado del tratamiento con GA₃ o IAA (**figura 39, *afs1***)

Por último, se realizó un estudio histológico a nivel microscópico comparativo del pericarpio de estos cuatro tipos de fruto (**WT; WT+GA₃; WT+IAA; *afs1***) (**figura 40**).

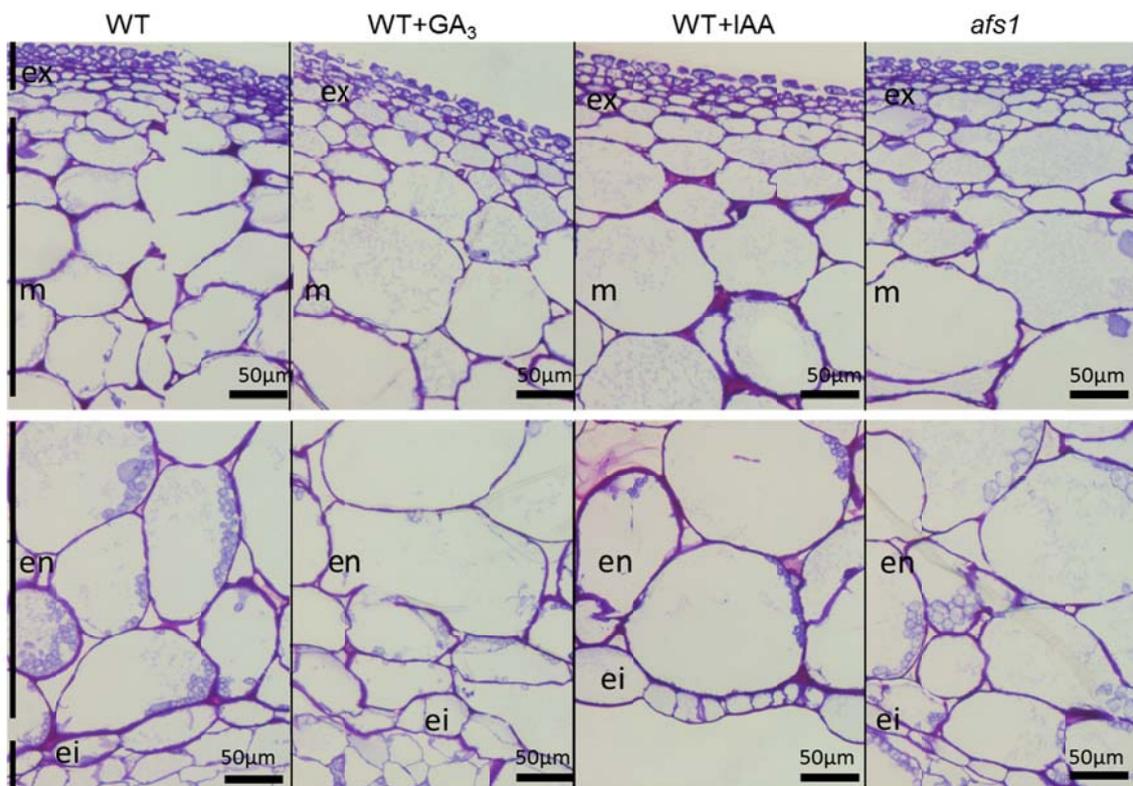


Figura 40. Comparación de cortes histológicos a nivel microscópico del pericarpio de fruto verde inmaduro WT, WT tratado con GA₃, WT tratado con IAA, y *afs1*. WT, pericarpio del fruto de la línea silvestre sin tratamiento; WT+GA₃, pericarpio del fruto de genotipo silvestre tratado con ácido giberélico; WT+IAA, pericarpio del fruto de genotipo silvestre tratado con ácido indolacético; *afs1*, pericarpio del fruto del genotipo mutante sin tratamiento. **ex, exocarpo; **m**, mesocarpo; **en**, endocarpo; **ei**, exocarpo interno. Todos los frutos analizados se encontraban en el estado verde inmaduro con 35DDA y con un diámetro aproximado de 4cm.**

Se puede observar en WT las diferentes áreas en las que se divide el pericarpio; exocarpo (ex), capa más externa formada por numerosas células y de pequeño volumen; mesocarpo (m), zona del pericarpio inmediatamente después de exocarpo donde van aumentando el volumen de las células que la componen desde el exterior al interior; endocarpo (en), capa interna del pericarpio con pocas células de gran tamaño; exocarpo interno (ei), capa de células que limita la parte interna pericarpio.

El pericarpio de los frutos tratados con GA₃, con IAA y en los frutos *afs1* se puede apreciar un mayor volumen celular en las células que forman el mesocarpo en comparación con la capa de células homóloga en el fruto WT. En resumen, el pericarpio de los frutos *afs1* sin manipulación posee una estructura celular similar a la de los frutos WT tratados con hormonas (giberelinas y auxinas), donde se observan células con mayores volúmenes sobre todo para la sección identificada como mesocarpo. No se aprecian otras diferencias remarcables en los cuatro tipos de frutos (**figura 40**).

2.7. Un factor medioambiental modula la expresión del fenotipo mutante *afs1*

Observaciones previas de este mutante en diversas experiencias apuntaban la posibilidad de que la aparición del fenotipo, en particular, el de tamaño de inflorescencias y flores donde se observaba la apertura del cono estaminal por su base debido al engrosamiento del ovario, pudiera estar sujeto a cambios ambientales. Para confirmar esta hipótesis, se realizó una experiencia encaminada a comparar la evolución del fenotipo en condiciones controladas en cámara de cultivo y en condiciones de invernadero respectivamente. La evaluación, se llevó a cabo en paralelo y con ocho individuos por genotipo, *afs1* y WT, en cada condición, invernadero y cámara de cultivo, donde se valoró visualmente, inflorescencia a inflorescencia la aparición del fenotipo característico de este mutante de cuaje de fruto con engrosamiento del cono estaminal por la base. Las ocho plantas mutantes cultivadas en invernadero durante 6 semanas presentaron el fenotipo mutante, a partir de la 3^a-4^a inflorescencia (**figura 41A**). Mientras, las ocho

plantas *afs1* cultivadas en la cámara de cultivo durante el mismo tiempo desarrollaron todas las flores y todas las inflorescencias con un fenotipo WT (**figura 41B**). Cuando estas plantas se trasladaron al invernadero en un estado de desarrollo donde empezaba a aparecer la 7^a-8^a inflorescencia se observó la aparición entonces del fenotipo mutante a partir de la 8^a inflorescencia (**figura 41C**).

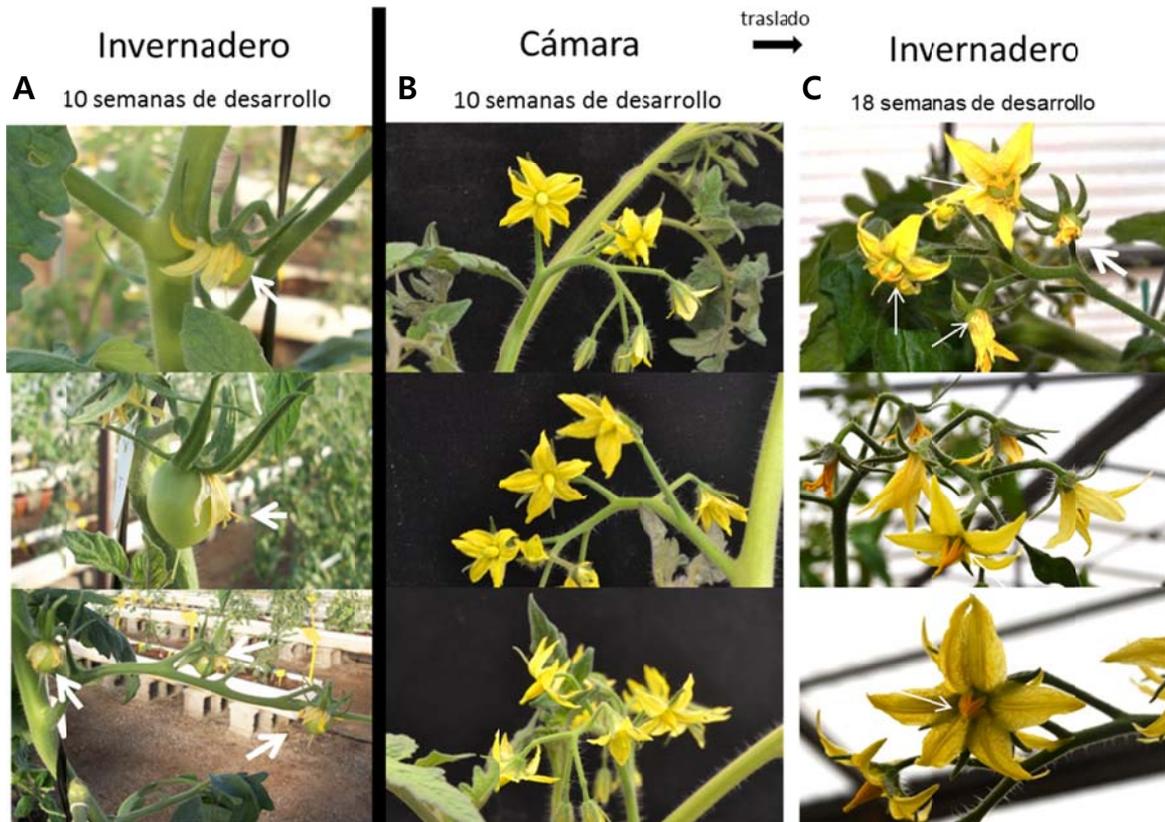


Figura 41. Incidencia del factor ambiental en el fenotipo. Todas las fotos mostradas correspondientes a plantas mutantes *afs1*. Tras 6 semanas de cultivo en invernadero el fenotipo de flor aparece en toda la población (n=8) (**A**), mientras que en cámara todas las plantas mutantes (n=8) presentaban flores con fenotipo WT (**B**), observándose que todas las inflorescencias y flores son indistinguibles de plantas WT. Posteriormente la población cultivada en cámara se trasladó al invernadero donde a las 8 semanas de desarrollo apareció el fenotipo mutante en toda la población (**C**).

Las plantas WT utilizadas como testigos en un igual número en esta experiencia no mostraron alteración alguna en la producción de inflorescencias, floración y cuaje de frutos, independientemente de la condición de cultivo, en invernadero o cámara de cultivo con posterior traslado a invernadero.

Por último es interesante resaltar que a pesar de que las dos poblaciones de plantas *afs1* fueron sometidas a diferentes condiciones de cultivo, condiciones controladas en cámara por un lado y condiciones de invernadero por otro, la mayor capacidad crecimiento vegetativo de *afs1* con respecto a WT no se vio afectada.

Estos resultados indican que hay un factor medioambiental en las condiciones de cultivo de nuestro invernadero, que no hemos identificado todavía, que induce la aparición del fenotipo mutante *afs1* en su vertiente de desarrollo reproductivo (mayor tamaño de inflorescencia con mayor nº de flores y flores con cono estaminal abierto por la base a causa del ovario engrosado que da lugar a fruto), y que por el contrario en cámara de cultivo en condiciones controladas no aparece.

2.8. Análisis de calidad de fruto. Los frutos *afs1* presentan un menor contenido en agua que se traduce en una mayor concentración de solutos como azúcares reductores y ácidos orgánicos

Debido a la mayor tasa de cuaje de fruto, que se refleja en la mayor producción del mutante *afs1* comparado con WT, rasgos de gran importancia agronómica, se consideró de gran interés llevar a cabo un análisis de calidad de los frutos mutantes.

Con los frutos maduros (rojos) recolectados *afs1* se ha llevado a cabo un análisis de calidad de fruto en cosecha, utilizando como controles frutos de plantas WT de la misma campaña y recolectados el mismo día (**figura 42**).

El análisis de la calidad de fruto se llevó a cabo mediante la determinación del peso medio del fruto, el diámetro, contenido de agua, el potencial osmótico, el porcentaje de salida de electrolitos del pericarpio del fruto, la firmeza (estimada como resistencia a la compresión), la producción de etileno, la tasa respiratoria, la acidez valorable (AV), el contenido de sólidos solubles totales (SST) y el índice de sabor o maduración (**tabla 21**).



Figura 42: Frutos recolectados para análisis de calidad. Imagen de frutos maduros (rojos) partidos longitudinalmente, para su análisis de calidad: WT a la izquierda, *afs1* a la derecha.

Los frutos *afs1* presentaron un menor promedio de peso y diámetro que WT (**tabla 21**), lo que se pudo apreciar también visualmente (**figura 42**). Sin embargo su contenido en agua y su potencial osmótico fueron significativamente menores que en WT, indicando una mayor acumulación de solutos (**tabla 21**). El aumento de la concentración de solutos en *afs1* apuntado por el potencial osmótico puede ser un reflejo del menor contenido de agua en los frutos mutantes. Este aumento de la concentración de solutos se refleja en una acumulación de azúcares reductores, tal como indica el significativamente mayor contenido en SST observado en los frutos mutantes, aunque también el contenido en ácidos orgánicos debe contribuir dada los mayores niveles de AV en *afs1*. El ratio SST/AV del índice de sabor o maduración es significativamente mayor en el fruto *afs1* que en WT, lo que indica que el fruto mutante presenta una mejor equilibrio dulce-ácido que repercute en un mejor sabor (**tabla 21**).

Otros parámetros de calidad importantes indican que los frutos *afs1* sufren un mayor grado de desintegración tanto de las membranas celulares como de las paredes celulares comparado con los WT, tal y como revela el significativamente mayor porcentaje de salida de electrolitos y la menor firmeza determinada como una menor resistencia a la compresión de *afs1* comparado con WT (**tabla 21**). Sin embargo, al contrario de lo que se esperaría examinando los anteriores resultados, la producción de etileno es significativamente inferior en *afs1* que en WT, aunque no se han observado diferencias significativas en cuanto a la tasa de respiración determinada mediante la producción de CO₂ (**tabla 21**).

La mayor concentración de solutos en el fruto *afs1* se refleja en los resultados del análisis metabolómico llevado a cabo en fruto. Los perfiles metabolómicos analizados fueron de azúcares (sacarosa y sus hexosas constitutivas), ácidos orgánicos principales (cítrico, málico y succínico), aminoácidos libres y finalmente los principales minerales (K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y P entre otros) (**tabla 22**).

	WT	<i>afs1</i>	t-test
Peso promedio fruto (g)	100,33 ± 1,84	41,47 ± 4,40	*
Diámetro (mm)	56,80 ± 1,04	42,71 ± 1,51	*
Contenido de agua (ml H ₂ O·g ⁻¹ PS)	12,15 ± 0,21	8,13 ± 0,25	*
Potencial osmótico (Mpa)	-0,99 ± 0,02	-1,43 ± 0,04	*
% Salida de electrolitos	47,14 ± 2,14	72,70 ± 6,05	*
% Resistencia a la compresión	62,58 ± 1,73	53,23 ± 1,86	*
Producción etileno (nlC ₂ H ₄ ·g h ⁻¹)	9,65 ± 0,32	5,94 ± 0,61	*
Tasa respiratoria (mgCO ₂ ·Kg h ⁻¹)	114,12 ± 9,96	128,11 ± 7,79	ns
Acidez valorable (% Ácido Cítrico)	0,41 ± 0,01	0,49 ± 0,02	*
SST (° Brix)	6,05 ± 0,08	8,82 ± 0,26	*
Índice de maduración	14,77 ± 0,33	17,96 ± 0,28	*

Tabla 21. Análisis de calidad en fruto. Los datos representan la media ± el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas entre las medias para $p < 0,05$ del mutante *afs1* en comparación con WT. **ns** indica que no existen diferencias significativas entre las distribuciones de ambas medias analizadas. SST, significa Contenido en Sólidos Solubles. n=3 para el Peso Promedio de frutos; n=15 para Diámetro y Resistencia a la compresión; n=6 para el resto de medidas.

	WT	<i>afs1</i>	t-test
Azúcares (g·100 g⁻¹ PF)			
Suc	0,026 ± 0,005	0,034 ± 0,003	ns
Glc	1,430 ± 0,030	1,821 ± 0,107	*
Fru	1,299 ± 0,027	1,597 ± 0,084	*
Ácidos orgánicos (g·100 g⁻¹ PF)			
Cit	0,270 ± 0,007	0,335 ± 0,023	*
Mal	0,158 ± 0,008	0,202 ± 0,020	ns
Succ	0,106 ± 0,007	0,119 ± 0,012	ns
Aminoácidos (µg·g⁻¹ PF)			
Gly	0,273 ± 0,013	0,175 ± 0,013	*
Pro	0,971 ± 0,085	3,302 ± 0,207	*
Val	3,163 ± 0,182	1,593 ± 0,283	*
Ile/Leu	34,892 ± 0,846	27,244 ± 2,384	*
Asn	4,832 ± 0,192	4,008 ± 0,160	*
Glu	82,306 ± 2,752	109,960 ± 3,904	*
Phe	13,488 ± 0,525	8,058 ± 0,807	*
Minerales (µg·g⁻¹ PF)			
Al	1,922 ± 0,242	1,706 ± 0,094	ns
B	2,962 ± 0,671	2,588 ± 0,320	ns
Ca	52,398 ± 1,547	49,095 ± 3,497	ns
Cu	0,255 ± 0,013	0,225 ± 0,015	ns
Fe	1,827 ± 0,102	1,280 ± 0,110	*
K	1099,094 ± 35,075	948,983 ± 43,413	*
Mg	40,288 ± 0,971	31,943 ± 0,914	*
Mn	0,472 ± 0,019	0,349 ± 0,013	*
Na	140,922 ± 1,760	121,833 ± 2,247	*
P	142,643 ± 3,770	123,301 ± 4,766	*
S	100,199 ± 1,522	83,530 ± 1,519	*
Zn	1,396 ± 0,103	1,521 ± 0,132	ns

Tabla 22: Análisis del perfil metabólico de la pulpa de fruto *afs1* y WT: azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos libres y composición mineral. Los datos representan la media ± el error estándar. El asterisco indica las diferencias significativas entre las medias para $p < 0,05$ del mutante *afs1* en comparación con WT. ns indica que no existen diferencias significativas entre las distribuciones de ambas medias analizadas. n=12 para las medidas de azúcares y ácidos orgánicos; n=6 para el resto de medidas. Solo se indican en la tabla aquellos aminoácidos que presentaron diferencias significativas en sus contenidos entre *afs1* y WT.

Al analizar los datos referentes al contenido en azúcares, se aprecia un aumento significativo de los contenidos de las hexosas glucosa y fructosa en *afs1* y se da una tendencia a la mayor concentración de sacarosa (**tabla 22**).

También con respecto a los ácidos orgánicos se observa un aumento significativo del contenido de ácido cítrico en el fruto mutante y una tendencia al aumento de ácido málico y succínico, principales ácidos orgánicos detectados en la pulpa de tomate (**tabla 22**). Estos resultados de los perfiles de azúcares y ácidos orgánicos corroboran los resultados obtenidos de sólidos solubles totales y acidez valorable, que eran significativamente superiores en el fruto *afs1* comparado con WT (**tabla 21**). Los resultados, cuando se expresan en base a peso seco, indican claramente que los mayores contenidos hallados de azúcares y ácidos orgánicos en *afs1* comparado con WT se deben a un efecto de concentración, debido al menor contenido en agua del fruto mutante (datos no mostrados). Con respecto a los aminoácidos libres también se han encontrado diferencias significativas en sus contenidos entre fruto *afs1* y WT. Llama la atención la marcada acumulación de prolina en la pulpa del fruto mutante, más de tres veces el contenido detectado en fruto WT. También se ha determinado un significativamente mayor contenido de glutamato en el fruto *afs1*, mientras que para los aminoácidos glicina, valina, isoleucina/leucina, asparraguina y fenilalanina, los contenidos son mayores en fruto WT pero en ningún caso se registraron diferencias tan marcadas como para la prolina entre ambos tipos de fruto (**tabla 22**).

Finalmente, con respecto a la composición mineral en cationes de los frutos se ha observado que *afs1* tiene menor contenido de estos elementos en general, siendo su disminución con respecto a WT significativa para hierro, potasio, magnesio, manganeso, sodio, fósforo y azufre (**tabla 22**).

2.9. La capacidad de conservación postcosecha de frutos *afs1* se ve negativamente afectada

Tras el análisis de calidad del fruto mutante en cosecha, se realizó un ensayo para determinar la capacidad de conservación postcosecha. En dicho ensayo de

conservación, tal y como se describe en material y métodos, se evaluó dicha capacidad en 2 situaciones: (i) conservación a temperatura ambiente (22°C), y (ii) conservación a bajas temperaturas (4°C) con un reacondicionamiento posterior a temperatura ambiente (22°C). La evaluación consistió en la determinación de la pérdida de peso de los frutos, la valoración del daño visual mediante una escala arbitraria (el número de frutos con depresiones y arrugamientos en su superficie con respecto al total de la muestra se expresó en %), y finalmente la estimación del impacto del estrés oxidativo mediante el análisis de la peroxidación de lípidos por determinación de la producción de malonil-dialdehído (MDA).

En la **figura 43** se muestran los resultados de la estimación del porcentaje de frutos con daños en su superficie con respecto al total al final de cada ensayo de conservación (7 días a 22°C o bien 7 días a 4°C + 3 días a 22°C), y la pérdida de peso que sufren los frutos *afs1* y WT a lo largo del ensayo (tras 2, 4 y 7 días a 22°C o bien, tras 2, 4 y 7 días a 4°C, y 7 días a 4°C + 3 días a 22°C). Se puede apreciar que los frutos del mutante *afs1* son mucho más susceptibles a sufrir mermas en su capacidad de conservación postcosecha, reflejado tanto visualmente en el mayor número de frutos afectados con respecto al total expresado en % como en la mayor pérdida de peso que sufren, tanto a temperatura ambiente (**figura 43A**), donde parecen estar muy afectados por la senescencia, como a lo largo de la conservación a bajas temperaturas (**figura 43B**) pero sobre todo tras el reacondicionamiento a temperatura ambiente (**figura 43C**), debido al superior impacto de los daños por frío sobre los frutos en este último tipo de ensayo de conservación.

En el ensayo de conservación a bajas temperatura con reacondicionamiento posterior se analizó también el impacto del estrés oxidativo debido a la conservación postcosecha mediante el análisis del grado de peroxidación de lípidos por producción de MDA (**figura 44**). Los resultados obtenidos indican que el fruto *afs1* es más susceptible al estrés oxidativo que el WT durante la conservación, pero además también lo es en el momento de la recolección, pues ya en el día 0, el día de recolección, los frutos mutantes presentaron un significativamente mayor grado de peroxidación de lípidos que WT (**figura 44**).

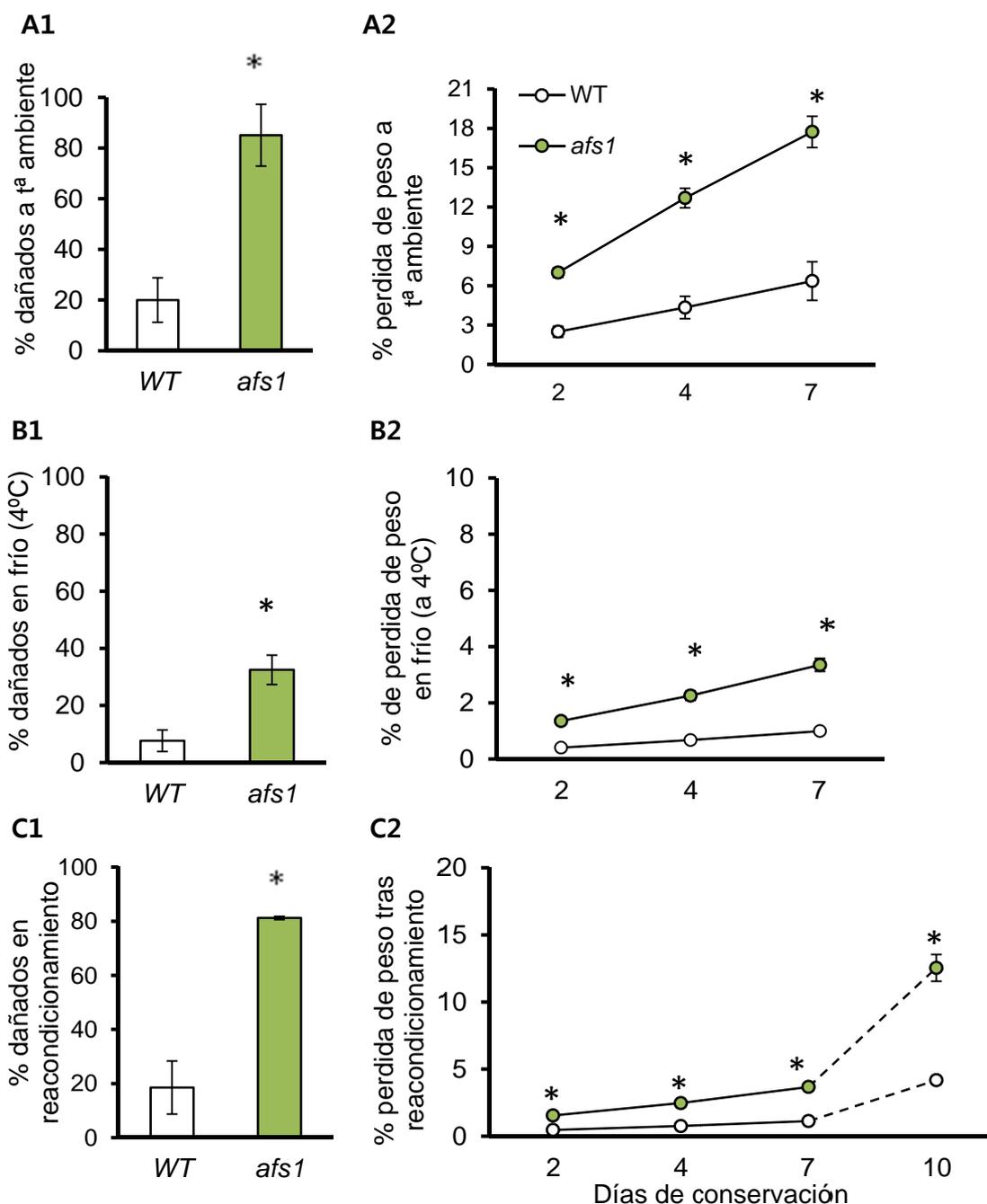


Figura 43. Ensayo de conservación a temperatura ambiente (A1 y A2) y a bajas temperaturas (B1 y B2), con reacondicionamiento posterior a temperatura ambiente (C1 y C2) de frutos *afs1* y WT. Los dos ensayos se llevaron a cabo con 3 réplicas por genotipo (*afs1* y WT) constituidas por 10 frutos cada una procedente de 8 plantas por genotipo. Los datos representan la media \pm el error estándar de los datos para cada muestra (n=3). Uno y dos asteriscos indican las diferencias significativas entre las medias para $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente del mutante *afs1* en comparación con WT. Los resultados de % de frutos dañados se han determinado al final de los respectivos ensayos de conservación. Los resultados en C1 y C2 son los mismos que en B1 y B2 (línea continua negra, a 4°C) excepto por la etapa de reacondicionamiento que se llevó a cabo tras los 7 días a 4°C (línea a trazos: a 22°C). Los 10 días indican 7 días a 4°C más 3 días a 22°C.

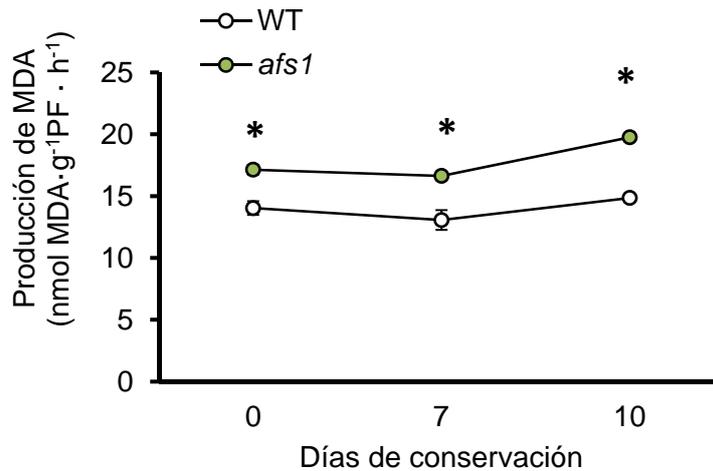


Figura 44. Grado de peroxidación de lípidos de los frutos *afs1* y WT sometidos a conservación a bajas temperaturas con reacondicionamiento a temperatura ambiente. El ensayo se llevó a cabo con 3 réplicas por genotipo (*afs1* y WT) constituidas por 10 frutos cada una procedente de 8 plantas por genotipo. La temperatura entre 0 y 7 días fue 4°C y se reacondicionaron los frutos a temperatura ambiente (22°C) durante 3 días al final del periodo de frío (7 días). Los 10 días indican 7 días a 4°C más 3 días a 22°C. Los datos representan la media \pm el error estándar de los datos para cada muestra (n=3). El asterisco indica diferencias significativas entre las medias para $p < 0,001$ del mutante *afs1* en comparación con WT. MDA: Malonil-dialdehído.

Los resultados para las distintas situaciones de conservación postcosecha, tanto para la pérdida de peso como para el porcentaje de frutos afectados por daños en la superficie debida a la senescencia o a los daños por frío, y para el grado de peroxidación de lípidos muestran inequívocamente una menor capacidad para la conservación postcosecha de los frutos *afs1* comparados con los WT.

Los resultados obtenidos indican que el fruto *afs1* es más susceptible al estrés oxidativo que el fruto WT durante la conservación, pero además también lo es en el momento de la recolección, pues ya en el día 0, el día de recolección, los frutos mutantes presentaron un significativamente mayor grado de peroxidación de lípidos que WT (**figura 44**).

3. Mapeo posicional de la mutación *afs1*

Como se ha mencionado en el **apartado 1.4** sobre el análisis de cosegregación fenotipo-genotipo, la mutación responsable del fenotipo *afs1* no está etiquetada por el doble inserto T-DNA localizado en su genoma. Es por ello que, con el objetivo de localizar en el genoma la mutación que provoca el fenotipo *afs1*, se ha iniciado un programa de estudio de asociación del genoma completo (GWA, del inglés Genome-Wide-Association study) aplicando re-secuenciación masiva del genoma y combinándolo con la estrategia de mapeo por clonaje posicional. Los GWA son análisis de una variación genética, en este caso la mutación *afs1*, a lo largo de todo el genoma con el objetivo de identificar su asociación a un rasgo observable, en este caso el fenotipo descrito *afs1*. Los GWAs suelen centrarse en asociaciones entre los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés Single Nucleotide Polymorphisms) aunque también se puede aplicar usando otros marcadores moleculares (Atwell et al., 2010).

Este estudio propuesto para determinar la localización genómica de la mutación responsable del fenotipo *afs1* consta de dos partes:

3.1. Generación y fenotipado de la población híbrida segregante necesaria para el análisis genómico GWA y mapeo por clonaje posicional

En primer lugar se ha llevado a cabo el cruzamiento del mutante, de una línea pura sin inserto T-DNA, es decir, homocigota para el fenotipo mutante y acigota para el T-DNA (este extremo se ha comprobado por análisis por PCR de gDNA con cebadores específicos para verificar la ausencia de la construcción) con un ecotipo distinto de un ancestro silvestre y polimórfico con respecto a este último, que es *Solanum pimpinellifolium* acc. LA1589. En este caso concreto, se polinizaron flores emasculadas de la línea pura *afs1* usando polen de *S. pimpinellifolium* para obtener la generación F1 híbrida. En dicha generación no se observó ninguno de los rasgos fenotípicos cualitativos del mutante: (1) engrosamiento del ovario y apertura del cono estaminal por la base en la flor, y (2) partenocarpia (**figura 45**). La población F1, al igual que la F2, no se pudo evaluar para los rasgos fenotípicos cuantitativos

de *afs1*: mayor tasa de crecimiento vegetativo expresado en altura o n° de hojas, y reproductivo expresado en n° de inflorescencias y n° de flores por inflorescencias además de mayor tamaño de flor, dado el hábito de crecimiento tan diferente de ambas poblaciones con respecto a tomate domesticado cv. Moneymaker donde se llevó a cabo la generación de la colección de mutantes donde se identificó *afs1*. El cultivar Moneymaker es de crecimiento indeterminado mientras que las plantas F1 como la progenie F2 presentaron un hábito de crecimiento determinado tipo arbustivo o semideterminado, con una arquitectura vegetal totalmente diferente a Moneymaker. Ello es probablemente debido al fondo genético *S. pimpinellifolium*, que como especie silvestre típica de tomate es de crecimiento determinado.

En la siguiente generación obtenida por autopolinización a partir de una sola planta F1, la generación segregante F2, al fenotipar se observó la aparición del fenotipo *afs1* en sus rasgos cualitativos. El análisis genético mediante el test χ^2 de la segregación fenotípica para el fenotipo cualitativo *afs1* se estudió en toda la población F2 (104 individuos), y se observó una segregación 77 WT : 27 *afs1*, resultando una χ^2_{1gl} de 0,05 para la hipótesis de partida de una segregación fenotípica acorde con una distribución 3 WT : 1 *afs1*, resultado que confirma la naturaleza monogénica y recesiva de la mutación *afs1* (**tabla 23**).

Tabla 23: Análisis genético de la población F2 para el fenotipo WT vs *afs1*. Resultado del test χ^2 del análisis de segregación fenotípica de la progenie F2.

M (3:1)	WT	<i>afs1</i>
Observado	77	27
Esperado (3:1)	78	26
$\chi^2_{1gl} =$	0,05	

$\chi^2_{1gl} (5\%) =$	3,84
------------------------	------

Después de un fenotipado exhaustivo de toda la población F2 se seleccionaron 16 individuos que presentaban fenotipo *afs1* con total seguridad y

otros 14 que no lo presentaban (asignándoles fenotipo WT) (**tabla 23**). Como hemos mencionado, el fenotipado se basó en la aparición de los rasgos fenotípicos de engrosamiento del ovario y apertura del cono estaminal por la base de la flor (**figura 45**) y en la aparición de frutos partenocárpicos, con ausencia de semillas o producción mínima de éstas (**tabla 24**). Sólo aquellas plantas donde se observó sin lugar a dudas la aparición de ambos rasgos, o bien su ausencia, se clasificaron como fenotipo *afs1* o WT respectivamente.



Figura 45: Fenotipado visual: Imágenes de flores de plantas F1 (izquierda), F2 con fenotipo WT (centro) y F2 con fenotipo *afs1* (derecha). Todas las plantas F1 obtenidas del cruce interespecífico *afs1* × *S. pimpinellifolium* acc. LA1589 resultaron de fenotipo WT.

De estas plantas se congelaron folíolos de hojas jóvenes planta a planta en nitrógeno líquido y se guardaron las muestras resultantes a -80°C . Con este material se llevará a cabo la extracción individual (por planta) del gDNA de cada una de las dos poblaciones seleccionadas, se cuantificará y se preparará un único pool con cantidades equimolares de DNA de cada uno de los individuos seleccionados.

Tabla 24. Poblaciones de plantas F2 seleccionadas por aparición del fenotipo *afs1* o no (fenotipo WT) para el estudio GWA y mapeo posicional. En verde se marcan las plantas con fenotipo *afs1*.

Planta nº de la población F2	fenotipado visual	fenotipado por semillas	nº de frutos total	nº semillas total	nº semillas/fruto
1	WT	WT	36	443	12,31
2	WT	WT	32	613	19,16
4	MU	MU	105	0	0,00
7	WT	WT	25	575	23,00
8	WT	WT	15	278	18,53
14	MU	MU	28	5	0,18
24	WT	WT	36	395	10,97
27	WT	WT	27	441	16,33
28	MU	MU	66	17	0,26
30	WT	WT	18	233	12,94
33	MU	MU	57	1	0,02
39	WT	WT	5	77	15,40
42	WT	WT	33	308	9,33
43	WT	WT	15	238	15,87
45	WT	WT	18	195	10,83
50	WT	WT	15	185	12,33
53	MU	MU	93	11	0,12
58	MU	MU	44	0	0,00
61	MU	MU	74	15	0,20
63	MU	MU	174	37	0,21
64	MU	MU	70	4	0,06
66	MU	MU	43	10	0,23
76	MU	MU	43	5	0,12
79	MU	MU	93	22	0,24
82	MU	MU	95	11	0,12
91	MU	MU	59	0	0,00
93	MU	MU	62	0	0,00
102	WT	WT	25	944	37,76
103	WT	WT	87	974	11,20
104	MU	MU	78	0	0,00

3.2. Re-secuenciación de genomas de las poblaciones seleccionadas F2

El pool de gDNA de los individuos mutantes se re-secuencia (no es necesaria una secuenciación *de novo* ya que se dispone de la información del genoma de referencia del tomate *Solanum lycopersicum* cv. Heinz 1706, publicada por The Tomato Genome Consortium, (2012) en un secuenciador HiSeq 2000 de Illumina Inc. (Instituto Max Planck, Centro de Genómica y Mejora Vegetal) utilizando una cobertura de 30X, que proveerá las secuencias donde se realizará el análisis bioinformático para calcular la estimación de las frecuencias alélicas a lo largo de todos los cromosomas de tomate.

Como la muestra es un pool de gDNA, la única región del genoma común en las diferentes secuencias es la que contiene la mutación, cuya frecuencia alélica será cero, mientras que las frecuencias alélicas en el resto del genoma se acercarán a 0,5 obteniéndose así una lista de polimorfismos en la región del genoma que tiene frecuencia alélica cero. Por último, usando marcadores moleculares se corroborará, tanto en individuos mutantes *afs1* como en individuos WT correspondientes a la misma F2, cuál de estos polimorfismos localiza la mutación responsable del fenotipo *afs1*.

Capítulo I: Discusión

4. Discusión

La partenocarpia es un rasgo de gran interés agronómico por dos razones principales: (i) en general por la obtención de frutos sin semillas *per se*, interesante para la industria del procesado, y (ii) en el caso de partenocarpia autónoma el cuaje de fruto independiente de polinización y por tanto mucho menos dependiente de las condiciones medioambientales, pues la capacidad de fecundación del polen tiene lugar en un rango relativamente estrecho de humedad y temperatura.

Sin embargo, la comprensión de los mecanismos fisiológicos y moleculares de inducción de la partenocarpia sigue siendo todavía limitada, lo que convierte al mutante *afs1* en un material de gran interés para abordar la investigación de este fenómeno. La mayoría de los trabajos de investigación desarrollados en relación con el cuajado de fruto con ausencia de semillas se han centrado en analizar la maduración del fruto, (Giovannoni, 2004, Fei et al., 2004, Lemaire-Chamley et al., 2005, Faurobert et al., 2007, Martinelli et al., 2009) aunque más recientemente se han centrado en el estudio de la regulación de los procesos que gobiernan el cuajado de dichos frutos (Pascual et al., 2007, Pascual et al., 2009, Vriezen et al., 2008, Wang et al., 2009), procesos de los que aún es más escasa la información a pesar de su importancia clave para entender cómo tiene lugar la partenocarpia.

4.1. El rasgo de partenocarpia provocada por la mutación *afs1* se comporta como un carácter monogénico recesivo

Para poder afirmar que una mutación es debida a la inserción de T-DNA, los criterios que se deben cumplir son que el fenotipo mutante aparezca con una segregación mendeliana y que co-segregue con la presencia del inserto de T-DNA (Shu et al., 2012).

El fenotipo presente en la mutación *afs1* fue identificado en una población segregante TG2 en una proporción correspondiente a un carácter monogénico y recesivo, sin que este mismo fenotipo apareciese previamente en la TG1. Las plantas con fenotipo *afs1* se caracterizan por presentar una mayor tasa de

crecimiento vegetativo y a nivel reproductivo se obtienen plantas con mayor número de inflorescencias, mayor número de flores por inflorescencia y una tasa de cuajado de frutos superior a la registrada para WT (**figuras 27, 28 y 30**). Estas plantas proporcionan un mayor rendimiento de frutos y éstos son partenocápicos con un atractivo perfil organoléptico (**figuras 29, 31, 32 y tablas 21 y 22**). El análisis genético realizado en diferentes poblaciones segregantes TG2 de forma independiente confirma el carácter monogénico y recesivo del fenotipo mutante *afs1* (**tabla 17**). Posteriormente se ha comprobado la ausencia de cosegregación entre fenotipo-genotipo (presencia de T-DNA) para una población segregante TG2 descartándose así la inserción de T-DNA como causante del fenotipo mutante (**tabla 18**). Se ha seleccionado como material para llevar a cabo su caracterización fenotípica y fisiológica una planta TG3 reintroducida *in vitro* para obtener réplicas clonales, o bien progenies TG4 procedentes de individuos TG3 genotipados como acigotos para el T-DNA pero con fenotipo *afs1* de las que se obtuvieron unas pocas semillas.

Tras descartar el inserto T-DNA como causante del fenotipo *afs1*, se considera que la mutación sea debida a una variación somaclonal (VS), término propuesto para describir la variabilidad genética causada por la manipulación en la multiplicación *in vitro* (Costa and Shaw, 2007). Se sabe que las plantas regeneradas a partir de cultivos *in vitro* sufren una serie de cambios genéticos y epigenéticos. Este fenómeno se conoce como variación somaclonal (VS) y la frecuencia con que realmente ocurre es mucho más elevada de lo esperado (Wang and Wang, 2012). Los mutantes con fenotipos de interés que no se deben a una inserción de T-DNA pueden aparecer entonces con una alta frecuencia en el cribado de una colección y puede hacer laboriosa la tarea para encontrar mutantes interesantes cuya mutación esté efectivamente etiquetada por el inserto T-DNA (Shu et al., 2012).

Independientemente de la causa es determinante definir si el fenotipo es debido a una mutación o una variación. Se puede considerar como mutación la VS que es meióticamente estable, es decir, que es hereditaria, por lo que las alteraciones fenotípicas detectadas se deben reproducir en las progenies y en las proporciones esperadas, según su carácter génico (Wang and Wang, 2012).

El fenotipo *afs1* se ha mostrado estable tanto en su patrón de expresión como en su carácter hereditario, hechos que indican que el fenotipo se debe efectivamente a una mutación somaclonal hereditaria. Por todo ello, y teniendo en cuenta el gran interés agronómico que tienen algunos de los rasgos que presenta *afs1* como la partenocarpia y la tasa de cuaje, y con el fin de identificar nuevos genes, vías o mecanismos que controlan el proceso de cuajado de fruto y la partenocarpia, se ha procedido a caracterizar fenotípica, morfológica y fisiológicamente el mutante *afs1*.

4.2. Efectos sobre el desarrollo vegetativo y reproductivo de la mutación *afs1*

Entre las características fenotípicas más representativas del mutante *afs1* se encuentra la mayor tasa de crecimiento, con plantas con mayor porte, mayor número de hojas y de inflorescencias que además presentan mayor número de flores, mientras que la arquitectura de la planta no sufría alteraciones que menoscabaran su desarrollo (**figuras 27A y 28**).

Desde el punto de vista del desarrollo vegetativo, encontramos similitudes relacionadas con otras líneas partenocárpicas relacionadas con la regulación hormonal, tan importante en estos procesos, como es el caso de línea transgénica de tomate transformada con una construcción antisentido del gen *SlIAA9* (Líneas *AS-IAA9*, *AntiSense-Indol Acetic Acid 9*) que participa en la vía de señalización por auxinas. La línea transgénica antisentido para este gen presenta, al igual que *afs1*, partenocarpia y un mayor ritmo de crecimiento pero además las hojas de este mutante presentaron alteraciones, dando lugar a hojas simples en vez de compuestas (Wang et al., 2005), lo que no se ha observado en *afs1*. Un fenotipo similar a nivel de desarrollo vegetativo se observa en la línea transgénica de tomate de sobreexpresión heteróloga de un gen que codifica para GA20-oxidasa del género citrus (*CcGA20-oxidasa*), enzima que participa en la biosíntesis de GAs bioactivas como GA₄, que además de dar frutos partenocárpicos y presentar mayor tasa de crecimiento vegetativo también sufre alteraciones morfológicas en las hojas. En estas líneas (denominadas líneas *GA20oxi-OE*, *Gibberelin20oxidase-*

OverExpression) los folíolos pierden los bordes aserrados característicos presentes en la línea WT (García-Hurtado et al., 2012).

En el caso del mutante de tomate partenocárpico *procera* (*pro*) que se caracteriza molecularmente por una pérdida de función del gen *SIDELLA*, que codifica para un represor de la síntesis de GAs, el fenotipo observado es el propio de una respuesta constitutiva a GAs produciendo plantas más esbeltas, con entrenudos más espaciados y tallos más delgados, y donde la partenocarpia facultativa está asociada a la longistilia (Carrera et al., 2012). La aproximación de utilizar la transformación genética para silenciar por RNA antisentido este gen en tomate afectó dio lugar a plantas con un fenotipo vegetativo y reproductivo muy similar al antes descrito: plantas también más esbeltas con tallos más delgados y alargados, y que producen también frutos partenocárpicos debido a la longistilia de la flor (Martí et al., 2007). En este último trabajo se evaluaron también plantas de tomate transgénicas con expresión heteróloga del alelo semidominante de *DELLA* homólogo de Arabidopsis *Atgail^{del}* en el cual en la secuencia se ha perdido el dominio que permite la degradación de DELLA. Estas plantas se caracterizaron por ser enanas, compactas, y las flores presentar longistilia lo que las hace parcialmente estériles, aunque la morfología microscópica del pistilo diverge entre los dos tipos de plantas transgénicas. Las características antes descritas para el tomate transgénico *Atgail^{del}* son las propias de plantas insensibles a GAs, como se espera para el caso de que la proteína DELLA se encuentre constitutivamente activa (Martí et al., 2007).

Sin embargo el rasgo más característico de nuestro mutante *afs1* lo encontramos entre sus flores, en concreto en el estado de anthesis, donde se observan anomalías morfológicas que consisten en la apertura por la base del cono estaminal debido al engrosamiento inusual del ovario (**figuras 23 y 27B y C**). Este rasgo fenotípico ha sido previamente descrito entre mutantes que presentaron partenocarpia, concretamente en diversos mutantes de tomate relacionados con un desajuste en el control hormonal relacionados con auxinas y GAs.

Entre los ejemplos más representativos y a la vez más estudiados encontramos la línea de sobreexpresión *SITIR1* (*Transport Inhibitor Response 1*) que sobreexpresa un receptor de auxinas tipo TIR1 del propio tomate. Las plantas transgénicas exhiben el cono estaminal abierto por su base mostrando el ovario engrosado y produciendo frutos partenocárpico (Ren et al., 2011), es decir, un fenotipo muy similar al observado en el mutante *afs1*. Sin embargo, esta línea exhibía alteraciones morfológicas en los foliolos y las plantas resultaron enanas (Ren et al., 2011), rasgos que no se han observado en *afs1*. Otra línea transgénica de tomate donde encontramos similitudes fenotípicas a *afs1* es la de silenciamiento para el gen endógeno *SIPIN4* (*Pin-like INFlorescence 4*) que codifica para un transportador de auxina de la familia de proteínas PIN-FORMED, cuya importancia radica en que son responsables de la generación de gradientes para la hormona auxina a lo largo de la planta. Las líneas de silenciamiento para *SIPIN4* muestran un fenotipo muy similar a *afs1* relacionado con la transición precoz de ovario a fruto, resultando el fruto partenocárpico (Mounet et al., 2012).

Estos trabajos de investigación inducen a pensar que las alteraciones descritas en el desarrollo tanto vegetativo como reproductivo del mutante *afs1* parecen estar relacionadas con la regulación hormonal del desarrollo, en particular relacionada con auxinas y GAs, pues su fenotipo tiene bastantes similitudes con el de mutantes y líneas transgénicas afectadas en genes implicados en la biosíntesis, percepción, señalización y transporte de estas hormonas vegetales.

4.3. La mutación provoca partenocarpia asociada a una mejora del rendimiento

El mutante *afs1* se caracteriza por presentar frutos de menor tamaño pero en mayor número, pero de tal forma que este segundo parámetro prevalece sobre el primero con el resultado de que el rendimiento es superior al registrado en WT (**figuras 29, 30, 31 y 42**). El aumento del rendimiento es una característica poco común, y a la vez muy perseguida en programas de mejora, entre las líneas que presentan partenocarpia. Mientras que en otros mutantes o líneas transgénicas donde la partenocarpia favorece la aparición de un mayor número de frutos

también de menor tamaño, el balance entre ambos parámetros da como resultado final que el rendimiento no se vea afectado. Este es el caso de la línea transgénica de tomate portadora de la construcción *PsEND1::barnasa*, compuesta por la región promotora del gen *END1* de guisante que se expresa de forma específica en las anteras fusionada con la secuencia codificante *barnasa* de *Bacillus amyloliquefaciens* que de una ribonucleasa, cuya expresión provoca la ablación genética de las anteras (Medina et al., 2013). En muy pocos mutantes o líneas transgénicas se ha podido asociar la producción de frutos partenocárpicos a un aumento neto de la producción. El primer mutante descrito con una mayor tasa de cuaje de fruto y por tanto con una mejora en el rendimiento fue el mutante *pat-1*, del cual se desconoce aún el gen o genes afectados pero se ha determinado que en el mutante se estimula uno o más pasos de la biosíntesis de GAs (Serrani et al., 2008). El mutante *pat-1* muestra una mayor tasa de cuajado y una mejora significativa del rendimiento (Mazzucato et al., 1998, Beraldi et al., 2004). Más recientemente se ha descrito este efecto positivo sobre el rendimiento en la línea transgénica de tomate para la sobreexpresión de *GA20oxidasa* (García-Hurtado et al., 2012), por lo que la mejora en el rendimiento parece estar estrechamente relacionado con el aumento de los niveles de GAs.

El seguimiento de los frutos cuajados realizado inflorescencia a inflorescencia en *afs1* (**figura 30**) muestra como la reducción del peso se mantiene constante desde las primeras inflorescencias, mientras que el aumento del número de frutos se da en estadios de desarrollo avanzados de la planta, es decir, en inflorescencias superiores, aunque no se puede descartar que esta evolución esté afectada con factores medioambientales. Es sabido que estos factores influyen significativamente en la aparición de partenocarpia de forma natural (Mazzucato et al., 1998). Los frutos *afs1* se caracterizan por presentar primordios seminales que no siguen su desarrollo hasta formar semillas verdaderas salvo en casos excepcionales, pero éstos no presentan malformaciones, asemejándose en aspecto visual y forma a los frutos WT, salvo por su menor tamaño (**figuras 23D, 27C, 32, 42 y tabla 21**).

Entre las líneas de tomate descritas por presentar partenocarpia encontramos la línea transgénica transformada con el vector binario *TPRP-F1::ro1B*.

TPRP-F1 es un promotor específico de ovario y fruto joven bajo el cual se controla espacialmente la expresión del gen *ro/B* implicado en la biosíntesis de auxinas. La transformación indujo la síntesis de auxinas en el ovario de la planta transgénica produciendo frutos partenocárpicos de tamaño similar a WT pero el balance final dio lugar a una reducción del rendimiento en la planta transgénica (Carmi et al., 2003). Otras líneas partenocárpicas también se han relacionado con cambios en la biosíntesis y/o la respuesta a las auxinas produciendo frutos de menor tamaño (Martí et al., 2007, Molesini et al., 2009, Mounet et al., 2012). Estos resultados parecen indicar que la aparición de la partenocarpia suele llevar asociado un descenso del rendimiento promovido por el menor calibre de los frutos partenocárpicos.

En la evaluación de la línea transgénica de tomate transformadas con la construcción *DefH9-RI-iaaM*, construcción derivada de la *DefH9-iaaM*, resultado de la fusión de la región reguladora del gen *DefH9* del género *Anthirrinum* específica para óvulos y placenta y la región codificante del gen *iaaM* de *Pseudomonas syringae* implicada en la síntesis de IAA pero cuya capacidad de expresión post-transcripcional del transgen se ve sensiblemente reducida comparada con la construcción original, se observó que la síntesis de auxinas aumentaba de forma manifiesta específicamente en óvulos con respecto a WT pero claramente menor que el nivel observado en la línea transgénica original *DefH9-iaaM*. Como en el caso de ésta última se observó una mayor tasa de cuaje y la producción de frutos partenocárpicos, pero los tomates producidos en la línea transgénica *DefH9-RI-iaaM* no mostraron diferencias significativas en cuanto a tamaño con respecto al WT (Pandolfini et al., 2002), lo que parece indicar que los niveles de hormonas, en este caso auxinas, es un factor determinante en rasgos como la tasa de cuaje, la partenocarpia y el tamaño de fruto.

4.4. El cuaje de fruto *afs1* tiene lugar prematuramente y su desarrollo está desacoplado con respecto a la evolución normal de la flor

La tasa de cuaje de fruto fue marcadamente elevada (84%) en la emasculación de flores *afs1*, aunque en flores WT emasculadas también llegó a cuajar fruto en una proporción significativa (26%) (**tabla 19A**). En ambos genotipos los frutos obtenidos siempre fueron partenocárpico. Este resultado, a primera vista sorprendente para WT, parece indicar que en la flor de tomate la operación de mutilación de los estambres puede activar, hasta cierto grado, el cuaje de fruto sin que medie la fecundación, resultando éste partenocárpico (Goetz et al., 2007).

Hay que resaltar la baja tasa de cuaje obtenida para las operaciones de autopolinización de WT (solo un 15%). Además, de los cruces que resultaron en fruto sólo la mitad lo fueron con semillas (**tabla 19B**). La baja cantidad de semillas obtenida señala que la capacidad de polinización y fecundación en el cultivar MoneyMaker en nuestras plantas cultivadas en invernadero no era óptima, presumiblemente debido a condiciones medioambientales no adecuadas en el momento de la ejecución de la operación, como rangos extremos de temperatura, humedad e intensidad de la radiación luminosa (Mazzucato et al., 1998). Además, podría ser también que la manipulación manual de la flor haya afectado negativamente a la producción de semillas (cruces WT (♂) X WT (♀)= 7,8 semillas/fruto, frente a las 74 semillas/fruto obtenidas a partir de frutos WT sin manipular) (**tabla 19B**). Este resultado concuerda con la observación hecha por Goetz et al. (2007) sobre el efecto de promoción de la partenocarpia debida a la ablación de los órganos masculinos que se lleva a cabo previo a la polinización manual por deposición de polen en el estigma.

Por otra parte, el porcentaje obtenido para el cuajado de frutos en el retrocruce *afs1* (♂) X WT (♀) fue el más bajo de todos los obtenidos (6,38%), y sólo un fruto presentó semillas, lo que indica que la viabilidad y capacidad de fecundación del polen *afs1* están muy afectadas y por tanto, su capacidad de polinización y fertilización (**tabla 19C**). Este hecho viene confirmado por el análisis

realizado de densidad de polen y capacidad de formación de tubo polínico, donde se observa que ambas propiedades se reducen mucho en *afs1* (**figura 33**).

Estos porcentajes tan bajos de cuaje de fruto contrastan con los obtenidos para los cruces realizados usando ovario del mutante *afs1* y polen del mismo mutante (autopolinización) o de WT (retrocruce) (94,44% y 69,57% respectivamente), donde sólo uno y dos frutos resultado de la autopolinización del mutante o de su retrocruce presentaron semillas en una cantidad mínima (1 y 10, respectivamente) (**tabla 19B y C**). Estas observaciones apuntan a que el proceso de cuajado en la línea mutante se inicia prematuramente, antes de antesis que es cuando las flores están preparadas para la polinización y fecundación. El cuaje y desarrollo prematuro del fruto es una de las características más representativas asociadas a la aparición de partenocarpia. Este efecto se ha observado en la mayoría de mutantes descritos afectados en la regulación hormonal de auxinas y giberelinas (revisado en (Azzi et al., 2015, de Jong et al., 2009a).

Todos estos datos, junto con la baja densidad y viabilidad del polen *afs1* detectado en el estudio de microscopia óptica (reducción para la densidad de hasta un 75% y para la viabilidad de un 40%, **figura 33**), indican un desarrollo anómalo para el gametofito masculino. Adicionalmente el seguimiento cronológico del desarrollo floral revela que el proceso de senescencia y dehiscencia de órganos florales tales como el cono estaminal y sobre todo los pétalos se retrasa en *afs1* (**figura 38**).

Está ampliamente descrito la dependencia de la fructificación del correcto desarrollo de la flor, en donde las auxinas y GAs desempeñan un papel clave (Yu et al., 2004, Aloni et al., 2006, Cheng and Zhao, 2007). Hasta la fecha los siete componentes de la señalización de auxina descritos, cuando los genes que los codifican, *AtARF8* de Arabidopsis y *SIARF7*, *SIIAA9*, *SIARF8*, *SIAUCSIA*, *SITIR* y *SIPIN4* de tomate, se alteran por mutaciones o transformaciones, tiene lugar una fructificación precoz que induce un inicio del desarrollo del fruto desacoplado de la antesis, dando como resultado frutos partenocárpicos (Wang et al., 2005, Goetz et

al., 2007, De Jong et al., 2009b, Molesini et al., 2009, Ren et al., 2011, Mounet et al., 2012).

En tomate se ha demostrado que el efecto de las auxinas sobre el cuajado y desarrollo del fruto está mediado, al menos parcialmente, por las GAs (Serrani et al., 2008, Serrani et al., 2010). Sin embargo, los mismos autores sugieren que las auxinas presentan funciones adicionales en el desarrollo del fruto, independientemente de las GAs. Además, existen evidencias de que la interacción entre auxinas y GAs es necesaria para la coordinación del desarrollo del fruto y de las semillas (Ozga et al., 2003, de Jong et al., 2009a). Los estudios en diferentes especies de fruto revelan que los niveles de hormonas endógenas de cultivares partenocárpicos eran mucho más elevados que los de los cultivares no partenocárpicos (Gustafson, 1939, Beyer, 1974, Mapelli et al., 1978). Por el contrario, parece estar reducido el nivel de hormonas endógenas del ovario sin polinizar antes del inicio de la senescencia (Pharis and King, 1985, Gillaspay et al., 1993).

4.5. Morfología de la flor e inicio del cuajado

Un rasgo común ligado a la partenocarpia en los diferentes mutantes caracterizados hasta la fecha es la aparición de alteraciones en las estructuras u órganos reproductivos. En la mayoría de los mutantes relacionados con auxinas los defectos provocados en la formación del gineceo conducen a un pistilo con una reducción o ausencia completa de óvulos en el ovario y la consecuente esterilidad completa (Cucinotta et al., 2014). Entre estas anomalías encontramos comúnmente también el mayor crecimiento de los pistilos provocando la extensión anormal del estilo y la protusión del estigma por encima del cono estaminal imposibilitándose así la autopolinización (longistilia). Aunque este efecto se ha observado en la línea *AS-IAA9* implicada en la señalización de auxinas *SLIAA9*, los autores del trabajo de investigación indican que la protusión del estigma es más bien debido al crecimiento acelerado y precoz del fruto que propiamente a una extensión *per se* anormal de la longitud del estilo, pero el hecho es que se impide la autopolinización y se desarrollan frutos sin semillas (Wang et al., 2005).

Un efecto similar se ha observado en *Arabidopsis* para la línea transgénica portadora de la variante alélica mutante *gAtarf8-4* que produce transcritos aberrantes para el factor de respuesta a Auxina *AtARF8*, cuyo producto está implicado junto con Aux/IAA9 en la formación de un complejo proteico que regula la iniciación del cuaje de fruto (Goetz et al., 2007). Dicho complejo es un represor del inicio del cuaje del fruto, que sólo ocurre cuando tiene lugar la síntesis y acumulación de auxina ya que la hormona actúa desacoplando el complejo al inducir la degradación de Aux/IAA9 por el proteosoma. En las plantas transgénicas *gAtarf8-4* se inducía la partenocarpia y se el desarrollo de pistilos de mayor tamaño que impedían la autopolinización. Presumiblemente la alteración del complejo proteico por las proteínas aberrantes *gAtarf8-4* afecta a su funcionalidad como represor de los genes de inicio de cuaje de fruto y la planta produce en consecuencia frutos partenocárpicos (Goetz et al., 2007). Curiosamente, la transformación con este mismo alelo en la variedad de tomate "Monalbo" potenció la partenocarpia pero no se observó la protusión del estigma (Goetz et al., 2007). Por el contrario, en la línea transgénica de tomate de silenciamiento por RNAi del gen endógeno *SIARF7* no se observaron alteraciones morfológicas en la flor pero sí la producción de frutos partenocárpicos. Según los investigadores de este trabajo, la función de *SIARF7* es prevenir el crecimiento del pistilo antes de que ocurra la fertilización (De Jong et al., 2009b). *SIARF7* actúa como un regulador negativo del cuaje de fruto antes de polinización y fertilización y como atenuador de genes de respuesta a auxinas. Pero cuando tras la polinización y fecundación tiene lugar un aumento del nivel de esta hormona la expresión de *SIARF7* se inhibe y en consecuencia se potencia la activación del proceso de cuaje y desarrollo de fruto. El silenciamiento por RNAi de *SIARF7* provoca la liberación de la ruta de señalización por auxinas induciendo el cuaje de fruto independientemente de que haya o no polinización y fecundación (De Jong et al., 2009b).

Pero la aparición de anomalías estructurales en la flor no solo se ha asociado a desequilibrios en la hormona auxina (IAA), sino también de GAs. Las flores de la línea de tomate de sobreexpresión *GA20oxi*, gen implicado en la biosíntesis de la giberelina activa GA_4 , presentan pistilos de mayor tamaño que

sobresalen del cono estaminal y dan lugar a frutos partenocárpicos, lo mismo que ocurre en los frutos de flores WT tratados con GA₄ (García-Hurtado et al., 2012). Otro fenotipo similar es el observado en plantas de tomate transgénicas que llevan una copia antisentido del gen *SIDELLA* bajo el control del promotor *CaMV35S* (*asSIDELLA*). *SIDELLA* codifica para un represor de la señalización por GAs requerido para el desarrollo de flores fértiles, y en la línea *asSIDELLA* el silenciamiento de dicho gen induce la partenocarpia facultativa y sus flores presentan longistilia y tienen un mayor tamaño que las WT (Martí et al., 2007). También el mutante de tomate *pro*, que presenta una mutación que provoca la pérdida de función de *SIDELLA*, aparece un fenotipo de respuesta constitutiva a GAs produciendo flores con longistilia (Carrera et al., 2012).

La malformación de anteras o la ablación de éstas es también común entre los mutantes que presentan partenocarpia. Las líneas que presentan este tipo de anomalías son androestériles y producen frutos partenocárpicos. Un ejemplo de ello es la línea transgénica *PsEND1::barnasa* que por medio de la expresión heteróloga del gen citotóxico *barnasa* usando un promotor específico de anteras, provoca la ablación de las anteras con pérdida de simetría bilateral (Medina et al., 2013). En la línea mutante *pat-1* se presentan aberraciones estructurales asociadas a las anteras, provocando androesterilidad (Mazzucato et al., 1998), y se ha asociado la partenocarpia resultante al aumento de la síntesis de GAs (Olimpieri et al., 2007).

La partenocarpia también se ha asociado a alteraciones en el proceso de desarrollo de órganos florales en tomate. Un ejemplo de esto lo encontramos en la línea transgénica de supresión de la expresión de un gen endógeno tipo *SEP* (denominado así por su homología con el gen *SEPALLATA* de *Arabidopsis*) denominado *TM29* (*TOMATO MAD BOX 29*, también *TAGL2*, *Tomato AG Like 2*) de tomate, cuya expresión se confina al ovario. Existen evidencias de que las proteínas *SEP* forman un complejo multimérico junto las proteínas tipo A (gen *macrocalix*, *mc*), B (gen *stamenless*, *sl*) y C (genes *TM6* y *TAG1*), fundamentales para el desarrollo floral. El modelo aceptado para explicar el desarrollo floral en tomate atiende al denominado modelo ABC donde existen 3 tres categorías génicas principales, genes tipo A, B y C (ver Coen and Meyerowitz, 1991; Meyerowitz et al.,

1991) que controlan el desarrollo de los distintos órganos florales. La mayoría de estos genes ABC son factores de transcripción de la familia MADS-BOX y están altamente conservados. Estas proteínas MADS se unen al gDNA como complejos multiméricos que controlan el desarrollo de órganos florales a través de la regulación de la expresión génica. Este modelo se ha completado con dos nuevos tipo de proteínas: las proteínas tipo D (que controlan la identidad del óvulo) y las tipo E, que se corresponde con genes tipo *SEP* como *TM29* (ver (Lozano et al., 2009). Atendiendo estrictamente al carácter partenocárpico, se ha comprobado que la línea de supresión de la expresión de *TM29* de tomate produjo flores aberrantes con alteraciones morfo-genéticas donde los estambres y ovarios eran infértiles, con el posterior desarrollo en los frutos partenocárpicos (Ampomah-Dwamena et al., 2002).

En relación con la formación de granos de polen y frutos partenocárpicos, encontramos la línea de tomate de sobreexpresión heteróloga del gen *STS* de uva implicado en la síntesis de estilbena, que provoca la aparición de frutos sin semillas debido a malformaciones en el polen que deviene infértil (Ingrosso et al., 2011). La expresión del gen de estilbena sintasa afectó el metabolismo de flavonoides provocando la esterilidad masculina completa en la línea transgénica de sobreexpresión 35S. Este trabajo sugiere como una razón para la ablación del polen, la depleción significativa de los ácidos cumárico y ferúlico, precursores de la biosíntesis de la lignina y esporopolenina que como consecuencia provocó un deterioro en compuestos estructurales que forman el polen.

Las flores del mutante *afs1* no presentaron anomalías ni diferencias morfológicas comparadas con las flores WT hasta el estado de antesis (**figura 34**), salvo el sensiblemente mayor tamaño del ovario (**figura 35**). Estas observaciones apoyan la hipótesis que el desarrollo del óvulo para dar lugar a fruto ocurre prematuramente, antes del estado de antesis, provocando el retraso de la senescencia y dehiscencia de pétalos y de estambres del fruto en desarrollo. El engrosamiento del ovario provoca la apertura por la base del cono estaminal de una flor que además sufre un retraso aparente en el tiempo en alcanzar el estado de antesis propiamente dicho (**figura 37**).

4.6. El desajuste hormonal como potencial causante de la partenocarpia en *afs1*

El cuajado de fruto también se puede inducir artificialmente mediante la aplicación de hormonas, siendo más eficiente si ésta se lleva a cabo con auxinas que con GAs (Abad and Monteiro, 1989, Serrani et al., 2007b). Los frutos inducidos por tratamientos hormonales presentan con frecuencia malformaciones así como características asociadas a mala calidad (Abad and Monteiro, 1989). De forma general, los frutos inducidos por aplicación de la giberelina GA₃ son más pequeños que los frutos polinizados y presentan cavidades locales vacías con un escaso desarrollo del tejido locular (Serrani et al., 2007b), mientras que la aplicación de auxinas induce la formación de frutos con un mayor tamaño que los polinizados, que presentan un tejido locular esponjoso e insípido (Chamarro, 1995). Sin embargo, se ha observado que la acción conjunta de ambas hormonas en las dosis adecuadas, puede conseguir que la morfología del fruto sea similar a la de uno polinizado, lo cual sugiere una interacción entre hormonas durante el crecimiento y desarrollo del fruto (Serrani et al., 2007b).

En nuestro ensayo, los porcentajes de cuajado de los frutos emasculados y tratados con GA₃ o IAA fueron muy parecidos (un 55%) y superiores que los registrados para el control (flores tratadas con solvente) (20%) (**tabla 20**), valor que se encuentra dentro de los normalmente obtenidos en experiencias similares (Pandolfini et al., 2002). Uno de los primeros eventos que inducen el desarrollo del fruto es un cambio en el balance hormonal de la flor. Los primeros cambios que tienen lugar en el ovario son la división y luego la extensión celular. Se asume de forma general que los frutos partenocárpicos inducidos por el tratamiento con GAs son de menor tamaño y se caracterizan porque el pericarpo está constituido por un relativamente menor número de células pero de mayor volumen mientras que en el pericarpo de los frutos cuyo cuaje se induce por tratamientos con IAA presentan un mayor número de células (Serrani et al., 2007a, Vriezen et al., 2008).

Con respecto a este punto cabe comentar cierta información que indica que la aplicación de GA y auxinas inducen diferentes efectos en el desarrollo histológico del tejido ovárico. Asahira et al. (1968) informaron de que la auxina indujo un

incremento del volumen celular, mientras que los frutos tratados con GA presentaron menor capacidad de división celular y peor capacidad de incremento de volumen celular. En contraste, Bunger-Kibler y Bangerth (1983) encontraron que la aplicación IAA provocó la formación de frutos con células más pequeñas, mientras que los frutos inducidos por GA₃ tuvieron considerablemente menos células pero más grandes. Además, también se ha descrito el desarrollo de pseudoembriones con diferentes morfologías en frutos inducidos tanto por auxinas como por GAs (Kataoka et al., 2003).

En frutos obtenidos de líneas transgénicas de silenciamiento para *SIARF7*, activador de la expresión de genes que atenúan la respuesta a auxinas, se observó un incremento de los niveles de auxinas antes de la polinización provocando la formación de frutos partenocárpicos con forma de corazón o fenotipo "Pickelhauben" (Pandolfini et al., 2002). Estos frutos presentan las cavidades locales vacías, una reducción de la placenta y un pericarpo constituido por células de mayor volumen que WT (De Jong et al., 2009b).

Al analizar la morfología de las secciones de los frutos obtenidos por tratamiento de flores WT con hormonas, concretamente con GA₃ e IAA, se observa que éstos carecen de semillas, al igual que los frutos *afs1*. Hay que destacar la ausencia de tejido locular en los frutos WT+IAA, hecho que no ocurre en los frutos *afs1* (**figura 39**). Al realizar la comparación de cortes histológicos del pericarpo de estos frutos no se observan diferencias para el exocarpo en los cuatro tipos de frutos pero en el mesocarpo de frutos tratados con hormonas (WT+IAA y WT+GA₃) y frutos *afs1* se aprecian células con mayor volumen celular que en WT (**figura 40**).

Los efectos observados para los frutos tratados con GAs se muestran acorde con lo descrito en la bibliografía en general, mientras que los efectos descritos para los frutos tratados con IAA encajan con los efectos descritos por Asahira et al. (1968) para la aplicación exógena de auxinas. Otra posible explicación para los resultados observados en frutos WT tratados con IAA es que ésta no haya sido completamente efectiva (Serrani et al., 2007a).

4.7. El factor ambiental en la partenocarpia

El patrón fenotípico en condiciones de cultivo controladas (en cámara de crecimiento controlado) para el mutante *afs1* fue indistinguible del fenotipo WT en cuanto a desarrollo de la flor y cuajado del fruto, pero la tasa de crecimiento vegetativo de las plantas fue superior a WT y los frutos obtenidos seguían sin tener semillas. En las distintas campañas de cultivo en invernadero, las condiciones medioambientales variaron ampliamente (tanto para la cosecha de verano como para la de invierno), influyendo en el grado de intensidad (cualitativa y cuantitativa) de ciertos rasgos del fenotipo *afs1* como la apertura por la base del cono estaminal, el incremento del número de órganos florales y la mayor tasa de cuajado de frutos. En contraposición a esta aparente modulación, la partenocarpia y el mayor porte de las plantas *afs1* con respecto a sus testigos fueron rasgos constantes en todas las condiciones de cultivo. Estos resultados indican que en invernadero tiene lugar una combinación de factores medioambientales, tanto en verano como en invierno, que provocan la aparición del fenotipo mutante de engrosamiento del ovario y apertura por la base del cono estaminal con cuaje antes de antesis, que no se dan en las condiciones controladas de nuestras cámaras de cultivo.

4.8. Calidad y conservación de frutos *afs1*

El principal proceso biológico que afecta a la calidad y conservación de del fruto es la maduración, etapa que se caracteriza por una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos tales como el ablandamiento de la pulpa, cambio en color de piel y pulpa, acumulación de azúcares, ácidos orgánicos y cambios en el perfil de emisión de compuestos volátiles que hacen que los frutos sean más atractivos para su consumo y de esta forma contribuyen a la dispersión de las semillas por la acción de los animales y el hombre (Gómez et al., 2014). El tomate es un fruto climatérico y por tanto su maduración se inicia cuando tiene lugar la crisis climatérica de la respiración asociada a la síntesis autocatalítica de etileno (Giovannoni, 2004). Los eventos relacionados con la calidad de fruto asociados a la maduración y regulados por la hormona etileno son (i) modificación del color por la degradación de la

clorofila y la acumulación simultánea de carotenoides y flavonoides; (ii) modificaciones en la textura por alteraciones en el turgor celular y en la estructura de la pared celular; (iii) cambios en la composición de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos volátiles; y (iv) mayor susceptibilidad a patógenos oportunistas debido a la pérdida de integridad de membrana celular (Giovannoni, 2004, Klee and Giovannoni, 2011, Gapper et al., 2013). En el tomate en particular las tres principales categorías de compuestos responsables del sabor son: (i) azúcares, principalmente glucosa y fructosa; (ii) ácidos orgánicos, principalmente ácido cítrico y málico, y (iii) compuestos volátiles, de los que se han descrito 20-30 que contribuyen al aroma (Centeno et al., 2011, Klee and Giovannoni, 2011, Osorio et al., 2011, Osorio et al., 2012, Gómez et al., 2014).

Se ha descrito que la ausencia de semillas puede mejorar la calidad de los frutos (Varoquaux et al., 2000), además de ser un carácter valorado por los consumidores (Rotino et al., 2005). En determinados casos los frutos partenocárpicos presentan características de calidad interesantes comparado con los frutos con semillas, como por ejemplo un mejor sabor resultado de un mayor contenido en sólidos solubles y una menor acidez (Lukyanenko, 1991).

Los frutos *afs1* muestran junto con el menor tamaño (**figura 42 y tabla 21**) y la ausencia de semillas (**figura 32**), un menor contenido de agua comparado con WT, que tiene un efecto de concentración de solutos, confirmado por los resultados del potencial osmótico. En *afs1* se ha observado un aumento del contenido del contenido en sólidos solubles y de la acidez valorable, es decir, de azúcares reductores y ácidos orgánicos. Pero el aumento relativo en el contenido de sólidos solubles fue superior al aumento en la acidez valorable, obteniéndose un índice de sabor o de maduración (SST/AV) mejorado con respecto a WT (**tabla 21**). Los resultados de metabolómica de los azúcares y ácidos orgánicos muestran para los frutos *afs1* un aumento significativo en glucosa, fructosa y ácido cítrico que confirman lo anterior (**tabla 22**). Estos resultados apuntan una mejora en el perfil organoléptico de los frutos *afs1* debido al aumento en hexosas y de ácido cítrico, que junto a la ausencia de semillas, los convierte en frutos atractivos para su comercialización.

Con respecto al a los cambios de color no se registraron diferencias entre ambos genotipos pero sí se observó una mayor pérdida de firmeza en los frutos *afs1* (**tabla 21**). Este fenómeno es en gran parte resultado del proceso de desintegración de la pared celular, estructura celular que proporciona rigidez y es la responsable de adhesión intercelular. Se inicia al finalizar la fase de crecimiento y desarrollo del fruto (Brummell, 2006) y parece verse más intensificado en *afs1*. Este comportamiento del mutante se podría explicar por su menor potencial osmótico, parámetro que junto con el potencial hídrico es un factor determinante de la turgencia. La maduración implica una reducción en la presión de turgor (Shackel et al., 1991, Harker and Sutherland, 1993), probablemente debido a la pérdida de agua por el fruto, que en el caso del mutante *afs1* es mayor. La disminución de la turgencia reduce la presión expansiva en la pared y contribuye a la pérdida de firmeza en el fruto (Brummell, 2006). En relación a la textura, aunque una excesiva pérdida de firmeza podría no ser una característica atractiva para el consumo en fresco, sí podría suponer una propiedad interesante para frutos destinados a la industria de procesado de tomate.

Los datos obtenidos para la producción de etileno muestran unos menores niveles para el mutante lo que sugiere que los frutos *afs1* presentan un estado más avanzado de maduración con respecto a los valores obtenidos para WT en el momento de la recolección, o bien que la síntesis autocatalítica de etileno tiene lugar antes que en WT (**tabla 21**). El mayor grado de desintegración de las membranas celulares en *afs1* determinado por la salida de electrolitos y de las paredes celulares determinado por la menor resistencia a la compresión parecen apoyar esta hipótesis, que sin embargo no parece reflejarse en los resultados de tasa respiratoria que no muestran diferencias significativas entre ambos tipos de fruto (**tabla 21**).

Finalmente hay que destacar la pobre capacidad de conservación postcosecha de los frutos *afs1* comparados con WT. Tanto a temperatura ambiente como a bajas temperaturas con posterior reacondicionamiento los frutos mutantes sufren una mayor deshidratación que se reflejan tanto visualmente como en la pérdida de peso (**Figura 43**). Igualmente los frutos mutantes son más susceptibles

al estrés oxidativo secundario que tiene lugar durante la conservación postcosecha como reflejan los resultados de peroxidación de lípidos (**Figura 44**).

Estos resultados de calidad de fruto y de conservación postcosecha en su conjunto parecen indicar que el estado de maduración de los frutos *afs1* es más avanzado que WT en el momento de la cosecha, a pesar de la rigurosa selección de frutos para realizar estos análisis. Este estado de maduración avanzado podría tener su origen en la desincronización ocurrida en el desarrollo precoz del fruto mutante y en el aparente retraso de la senescencia que tiene lugar en distintos órganos de la planta como anteras y pétalos al inicio del proceso de fructificación de los frutos *afs1*. Estas características fenotípicas del mutante tan pronunciadas desde el punto de vista del desarrollo reproductivo podrían tener un reflejo en alteraciones en la regulación de la maduración, un proceso altamente complejo que comprende en el caso de frutos climatéricos de mecanismos de regulación dependientes de etileno pero también independientes de etileno, tanto aguas arriba del control molecular de la maduración por parte de la hormona como en paralelo a éste (Adams-Phillips et al., 2004, Giovannoni, 2007, Matas et al., 2009, Klee and Giovannoni, 2011, Kumar et al., 2014).

4.9. La obtención de líneas híbridas F2 resultado del cruce del mutante *afs1* con el ecotipo *Solanum pimpinellifolium* LA1589 corrobora el carácter monogénico y recesivo de la mutación *afs1*

El análisis de segregación genético que revela que la mutación *afs1* es monogénica y recesiva, y la gran relevancia agronómica de las características fenotípicas del mutante nos ha llevado a iniciar un programa de estudio de asociación del genoma completo (GWA, Whole-Genome Association) combinado con el clonaje posicional, en estrecha colaboración con el grupo de investigación de Genética del Prof. Rafael Lozano de la Universidad de Almería, con el objetivo de hallar la localización genómica de la mutación.

Para ello se ha cruzado el mutante *afs1* (ovario) con el ecotipo de la especie silvestre relacionada con tomate *Solanum pimpinellifolium* acc. LA1589 (polen). *S. pimpinellifolium* es una fuente para el cultivo de líneas de introgresión en tomate domesticado (*S. lycopersicum*). Esta especie es uno de los parientes silvestres más cercanos de *S. lycopersicum* y está presente en el linaje de algunos cultivares comerciales tales como el secuenciado 'Heinz 1706' (The Genome Consortium, 2012). Han sido varios los grupos de investigación que han generado mapas de ligamiento de cruces entre *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* (Grandillo and Tanksley, 1996, Chen and Foolad, 1999, Lippman and Tanksley, 2001, Doganlar et al., 2002, Sharma A, 2008, Gulick et al., 2009, Sim et al., 2012). El genotipado con marcadores moleculares permite la visualización de los patrones de recombinación, siendo este punto crucial para la localización de loci asociados a rasgos segregantes (Paran et al., 1995, Mézard, 2006).

Tras cruzar con éxito ambos ecotipos, el análisis genético llevado a cabo en F2 por el test χ^2 para la segregación del fenotipo *afs1* corroboró el carácter monogénico y recesivo de la mutación; no apareciendo plantas con frutos partenocárpicos ni engrosamiento precoz del ovario en la progenie híbrida F1 mientras que sí apareció en las proporciones esperadas en la progenie segregante F2 (3 WT: 1 *afs1*).

Por otra parte, los análisis de polimorfismos genéticos usando técnicas WGA está siendo cada vez más utilizada para la localización genómica de mutaciones que afectan al fenotipo. Aunque el trabajo pionero se llevó a cabo usando mapas genéticos con millones de polimorfismos para analizar la variación genética en los seres humanos (Sabeti et al., 2007), este enfoque también se está aplicando con éxito en plantas de interés agronómico. Un ejemplo de ello lo encontramos en el maíz, donde las poblaciones de exploración derivadas de líneas de alto y bajo contenido en producción de ácido palmítico, con cerca de 500 marcadores genéticos, reveló la existencia de más de 50 QTLs que influyen en este rasgo, donde cada locus es responsable de pequeños niveles de varianza genética (Laurie et al., 2004).

Los estudios basados en comparaciones del genoma de maíz (*Zea mays* spp. *mays*) y su progenitor el teosinto (*Zea mays* spp. *parviglumis*) están permitiendo grandes avances en la identificación de los genes candidatos de la selección artificial aplicada por el hombre americano. En un estudio inicial, el análisis de secuencias genómicas para 774 fragmentos de genes en 14 líneas de maíz y 16 líneas de su progenitor teosinto llevó a estimar en más de 1.000 los genes que se han visto influenciados por la selección artificial del hombre en la evolución del teosinto hasta las variedades de maíz analizadas (Wright et al., 2005).

Un estudio similar de la variación genética para las accesiones de girasol cultivado y silvestre (*Helianthus annuus*) reveló evidencias de la influencia de procesos de selección durante el período transcurrido en la domesticación para varias docenas de regiones genómicas del girasol (Chapman et al., 2008). Estos estudios sugieren que los análisis genéticos usando técnicas de exploración de genoma completo son un enfoque útil y prometedor para la identificación de genes que influyen en rasgos importantes para las especies de interés agronómico.

La disponibilidad de un gran número de marcadores como son los nucleótido único (SNP) han aumentado la eficiencia de este proceso. En el tomate, la disponibilidad colecciones de alto rendimiento para localizar SNPs permite la detección masiva en paralelo para genomas completos de diferentes genotipos (Sim et al., 2012, Viquez Zamora et al., 2013).

Hoy en día, las tecnologías de secuenciación masiva de nueva generación están ofreciendo nuevas maneras de aumentar el rendimiento del genotipado en varios órdenes de magnitud (Huang et al., 2009). Aún más, es posible combinar diferentes plataformas de genotipado para aumentar la potencia de los análisis. Además, debido a la publicación del genoma completo de tomate (The Genome Consortium, 2012), los enfoques de re-secuenciación de nueva generación se pueden aplicar en el germoplasma relacionado (Causse et al., 2013). Los estudios sobre los rasgos importantes que subyacen de la evolución y la domesticación, así como las bases genéticas, pueden beneficiarse de estas herramientas genómicas (Aflitos S, 2014).

4.10. Interés agronómico y biotecnológico del mutante *afs1*

En especies hortícolas como el tomate la biotecnología puede servir para generar variedades con rendimientos más elevados, con mejores características de calidad de fruto en el aspecto organoléptico y nutricional, y resistentes a condiciones adversas de cultivo, como estreses abióticos y plagas y enfermedades. El tomate es una especie muy sensible a las condiciones ambientales, en particular a las temperaturas demasiado bajas o demasiado altas que afectan al desarrollo reproductivo, en especial del polen así como a la dehiscencia de las anteras. Como consecuencia, la eficiencia de la producción de tomate está restringida a ciertas zonas climáticas. Por esta razón, las compañías de semillas de tomate disponen de plantaciones en diferentes lugares del mundo para desarrollar nuevos cultivares adaptadas a las condiciones locales para alcanzar valores de producción óptimos bajo las condiciones climáticas de la zona (de Jong et al., 2009a).

La mutación *afs1* presenta como rasgos fenotípicos de gran interés en agricultura la partenocarpia y la ausencia de malformaciones en los frutos, pero también el rendimiento es superior al del cultivar de donde procede (Moneymaker), fundamentalmente debido a un mayor nº de flores por inflorescencia y a una superior tasa de cuaje de fruto. La partenocarpia así como el aumento del rendimiento constituyen caracteres de gran interés agronómico y constituyen objetivos perseguidos por los mejoradores, cooperativas y empresas agro-alimentarias y las industrias relacionadas, que durante muchos años han desarrollado diferentes estrategias encaminadas a la obtención de mejores rendimientos tanto cuantitativa como cualitativamente.

Una de las estrategias desarrolladas es la aplicación de hormonas reguladoras del desarrollo y crecimiento como auxinas y GAs, las cuales inducen el cuajado del fruto sin fecundación y permiten la obtención de frutos en condiciones ambientales desfavorables para la polinización (Chamarro, 1995). El punto débil de esta estrategia es el subsecuente aumento de los costes de producción por lo que se ha aplicado en escasas situaciones. Otra consecuencia que supone la aplicación exógena de estos fitoreguladores es que producen malformaciones en

los frutos haciendo que éstos pierdan valor comercial o este sea muy limitado (Abad and Monteiro, 1989, Serrani et al., 2007b).

Dicho esto, el carácter partenocárpico y la mayor producción asociado a la mutación *afs1* hacen de ésta y del gen responsable dianas para su introgresión en variedades de élite. La introgresión de la mutación *afs1* en variedades comerciales puede repercutir positivamente en la calidad del fruto. El mutante *afs1* puede ser utilizado como parental femenino en los programas de mejora encaminados a la obtención de híbridos. Finalmente, los frutos de tomate sin semillas presentan un alto interés para las industrias agroalimentarias dedicadas a la preparación de zumos, purés, salsas y sopas, donde es necesario eliminar las semillas por tamizado de las pastas antes de su procesado (Varoquaux et al., 2000). En este sentido, el hecho de que los frutos de plantas portadoras de la mutación *afs1* carezcan de semillas podría representar una reducción de los costes de producción para las empresas de procesados.

Capítulo II: Resultados

Capítulo II:

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE *wak1* AFECTADO EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS SALINO

1. Identificación y caracterización molecular del mutante *wak1* (*Wall-Associated Kinase*)

En una primera etapa se llevó a cabo la identificación de mutantes a partir de la colección de líneas T-DNA de tomate generadas a partir del cv. Moneymaker, y se preseleccionaron 20 líneas T-DNA., algunas de ellas por mostrar alteraciones fenotípicas y otras en base a la expresión del gen delator *Uid A* (GUS) mediante tinción en los diferentes tejidos vegetales. La preselección de líneas se realizó tanto en la primera generación de plantas transformadas (TG1) como en la población segregante (TG2) obtenida por autofecundación de las plantas TG1. Entre todas las líneas preseleccionadas, es interesante señalar la línea 233 ETMM por ser la única línea que mostró expresión del gen delator en raíz, órgano de la planta que está en contacto directo con la solución salina y, por consiguiente, el órgano responsable de la absorción y transporte de iones salinos a la parte aérea. La posterior evaluación fenotípica de esta línea en condiciones salinas ha mostrado segregación para tolerancia a la salinidad, y actualmente es una de las líneas con las que se sigue trabajando en el laboratorio.

El mutante seleccionado para llevar a cabo la caracterización fenotípica, fisiológica, genética y molecular en este trabajo es el mutante recesivo 232 ETMM. En las plantas TG1 (procedentes directamente de la transformación), no se observaron diferencias fenotípicas con respecto a las plantas WT en condiciones control. Sin embargo, en la población TG2 se observó una segregación para albinismo. Las plántulas con fenotipo albino morían al estado de cotiledón y la segregación se ajustaba a 3 WT : 1 M (fenotipo albino).

En el laboratorio del Prof. Lozano (UAL) se realizó el análisis Southern Blot con la sonda *FA-nptII* para un pool de 12 individuos TG2 (**figura 46**), observando la

presencia de un solo inserto de T-DNA en la línea 232ETMM. Tras corroborar la existencia de un único inserto, en dicho laboratorio se secuenció la región genómica flanqueante al inserto por medio de la técnica Anchor-PCR. La secuenciación se llevó a cabo tanto por RB (Right Border) como por LB (Left Border) del inserto de T-DNA, localizando el inserto a 936 pb aguas arriba del gen Solyc09g014720, concretamente en la posible región promotora para dicho gen, que se encuentra en el cromosoma 9 del genoma de *Solanum lycopersicum*.

La información relacionada en la base de datos Sol Genomic Network (www.SGN.org) identifica este gen como parte de un clúster de 4 genes de la familia de las proteínas "Kinasas asociadas a pared" (WAK - Wall Associated Kinase), de *Arabidopsis thaliana*.

Se realizó un análisis de alineamientos múltiples entre las secuencias implicadas (Solyc09g014710, Solyc09g014720, Solyc09g014730 y Solyc09g014740) y 26 secuencias descritas en *Arabidopsis thaliana* (1-5 Atwak y 1-21 Atwakl, (Verica et al.,2002)), 4 secuencias descritas para *Oriza sativa* (4 genes tipo WAK) y 4 secuencias descritas para *Triticum aestivum* (4 genes tipo WAK, (Liu et al.,2006)).

Los resultados muestran que las cuatro secuencias del clúster SL2.40.Ch09-6778050 están muy conservadas entre sí (Conservation Score=96%, <http://tcoffee.crg.cat/>) por lo que, con alta probabilidad, corresponden a isoformas entre sí. El análisis mostró que a pesar de que estas isoformas presentan mayor similitud con el gen *AtWAK2* de *A. thaliana*, el alto grado de divergencia existente entre los genes *WAK* de *A. thaliana* y *S. lycopersicum* no permite establecer una relación de homología, en este caso, con el gen *AtWAK2*. El gen de tomate Solyc09g014720 ha sido identificado en tomate recientemente (Rosli et al.,2013) y se ha denominado *S/WAK1* por ser el primero que se ha identificado en esta especie.

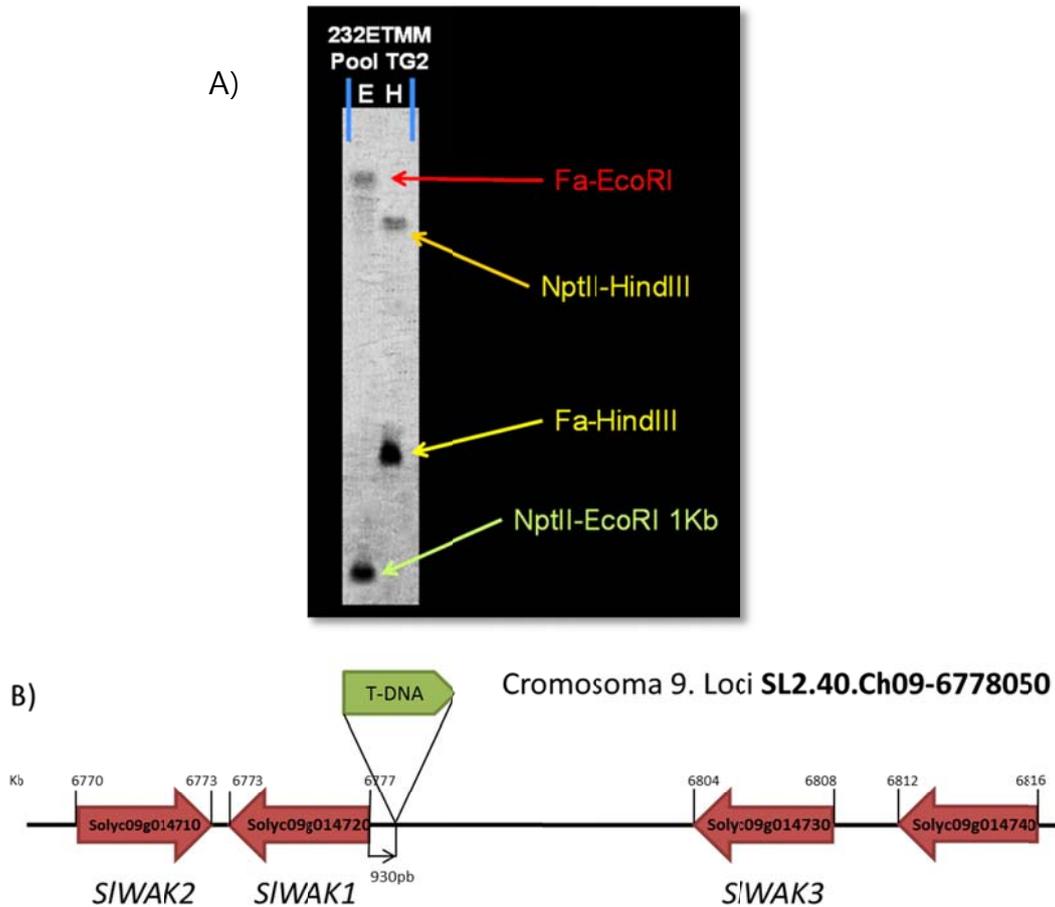


Figura 46. Análisis Southern Blot y localización genómica del inserto de T-DNA indica la presencia de un único inserto para un gen tipo *Wall-Associated Kinase (WAK)*. A) Southern Blot con la sonda FA-NptII para un pool de individuos TG2 de la línea 232ETMM indica que esta línea presenta un solo inserto. E, EcoRI; H, HindIII. B) Análisis por Anchor-PCR etiquetó tanto por RB como por LB la región genómica del cromosoma 9. El T-DNA se inserta aproximadamente a 950 pb del gen Solyc09g014720, pudiendo afectar a su región promotora. Este gen es parte de un cluster formado por 4 genes que parecen ser isoformas. El análisis Southern Blot y la clonación del gen se han realizado en el Laboratorio dirigido por el Prof. R Lozano de la UAL.

2. Estudio de co-segregación fenotipo-genotipo. Identificación de líneas Homocigotas para el inserto de T-DNA

En la población TG2 del mutante que segregaba para albinismo se realizó un test de resistencia a kanamicina y se comprobó que el fenotipo del mutante albino no estaba asociado a resistencia a kan (**figura 47A, B**). Se analizaron 25 plántulas y el test se repitió dos veces con resultados similares.

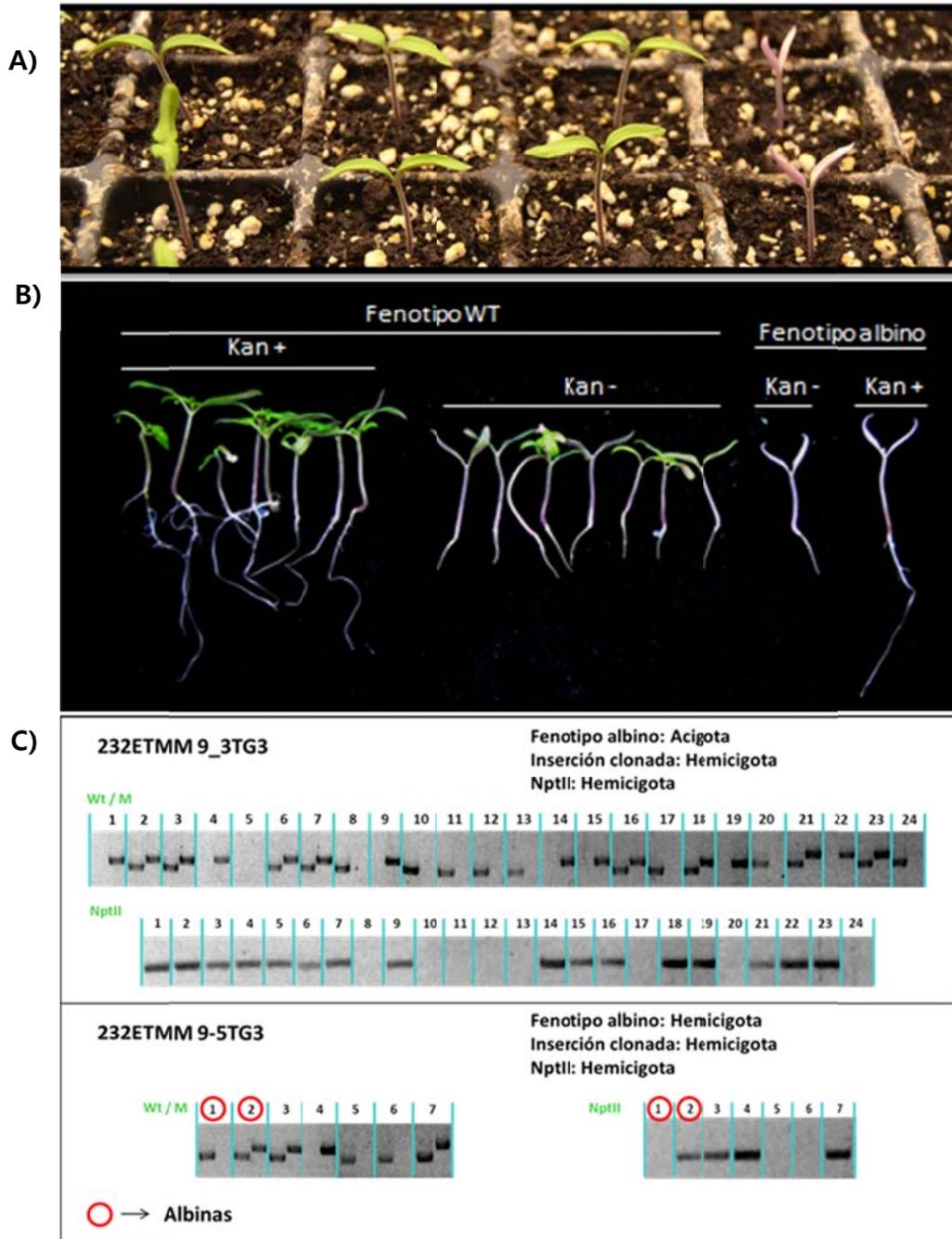


Figura 47. La inserción clonada (WAK) cosegrega con *nptII* pero no con el fenotipo albino. A) Segregación para albinismo en la población TG2 de la línea 232 ETMM. B) El test de kanamicina demuestra que el fenotipo mutante de albinismo no está asociado a tolerancia a kanamicina. C) Genotipado por PCR para la presencia tanto del gen *SIWAKI* como *nptII* en dos líneas TG3, la primera que no segrega para albinismo y la 2ª que si segrega. En la línea 232ETMM 9_5 TG3, segregante para el fenotipo de albinismo y para la presencia del inserto, se corrobora que la presencia del inserto de T-DNA no co-segrega con el fenotipo de albinismo. El genotipado se ha realizado en el laboratorio dirigido por el Prof. R Lozano Departamento de Biología y Geología, de la Universidad de Almería.

En dos líneas de la tercera generación (TG3), se comprobó que la inserción clonada (WAK) cosegregaba con *nptII*, mientras que esta inserción no era responsable del fenotipo albino letal en estado de cotiledón, como se demuestra en el genotipado por PCR (**figura 47C**) para la presencia tanto del WAK como del gen *nptII*. Tras descartar la relación del fenotipo albino y la presencia del inserto de T-DNA, el trabajo se centró en la selección de líneas sin fenotipo albino y segregantes para la presencia del T-DNA (línea 232 ETMM 9.3-TG3).

A partir de la población que no segregaba para albinismo y si para la presencia del T-DNA (232 ETMM 9.3-TG3) se genotiparon por PCR un total de 120 individuos y se identificaron 33 homocigotos para la presencia del T-DNA, ajustándose al patrón de segregación correspondiente a una mutación con carácter recesivo (3WT : 1M). Algunas de estas líneas se trasladaron a invernadero para la obtención de líneas homocigotas estables (líneas TG4) para el inserto de interés (**figura 48**) con el fin de iniciar la caracterización del mutante y tratar de dilucidar el papel del gen etiquetado, el gen *SIWAK1*.

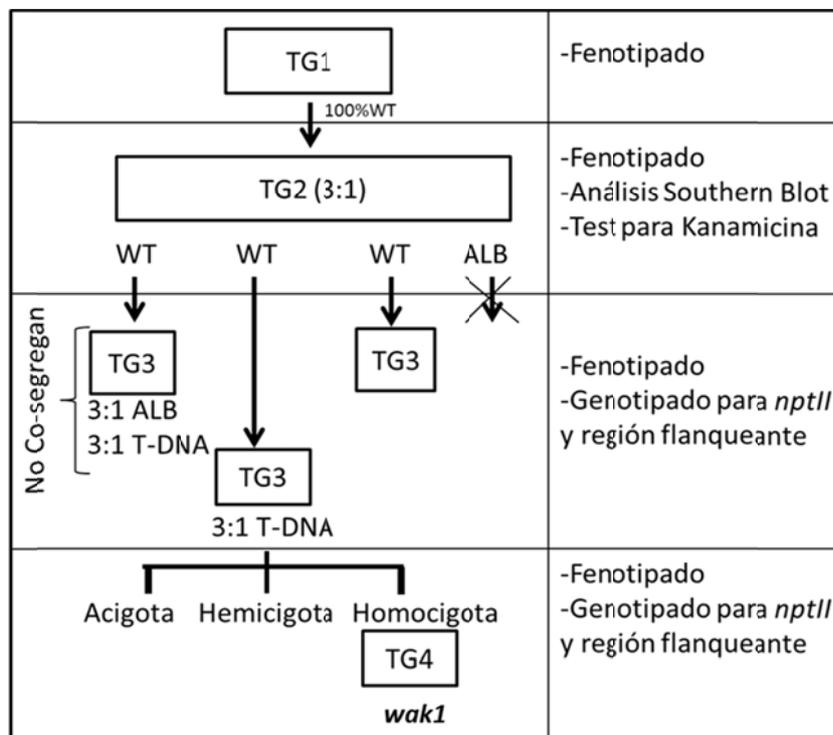


Figura 48. Esquema de identificación de la línea mutante, homocigota para la mutación *SIWAK1*.

Una vez recolectadas las semillas de las diferentes líneas, se comprobó que eran homocigotas para la presencia del inserto de T-DNA. Se seleccionó finalmente la línea 232 ETMM 9.3.11-TG4 para llevar a cabo la caracterización del mutante, denominado de aquí en adelante '*wak1*' (**figura 48**).

3. El gen *SIWAK1* se expresa en raíz y reduce su expresión con la salinidad en el cultivar Moneymaker

En primer lugar se llevó a cabo el análisis espacial de expresión del gen *SIWAK1* por PCR a tiempo real (qRT-PCR) en plantas WT desarrolladas en condiciones control, y al estado de desarrollo de 6 hojas verdaderas se tomaron muestras de diferentes partes de la planta. Los resultados obtenidos en dos experimentos independientes muestran que no hay expresión del gen *SIWAK1* en las diferentes partes analizadas de la parte aérea de plantas WT, y solo se expresa en raíz (**Figura 49**).

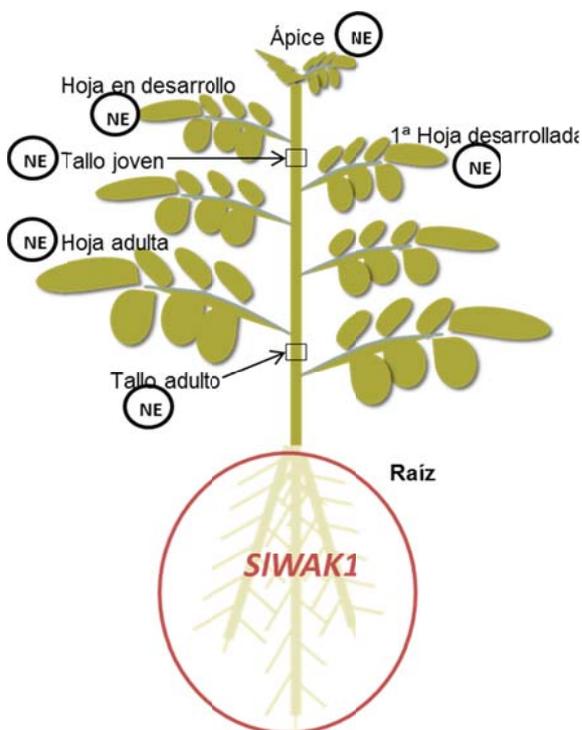


Figura 49. Patrón de expresión espacial de expresión para *SIWAK1*. La raíz es el único órgano donde se expresa el gen *SIWAK1* en plantas WT desarrolladas en condiciones control. Representación esquemática del estado de desarrollo y partes de la planta donde se ha analizado la expresión del gen *SIWAK1* en dos experimentos independientes, con 3 réplicas biológicas (n=5). No expresión (NE) = valores de Ct por encima de 26,5 ciclos. Eficiencia para los cebadores *SIWAK1*, e=0,99.

La etapa siguiente fue analizar la expresión temporal del gen *SIWAK1* y los genes flanqueantes *SIWAK2* y *SIWAK3* en raíces de plantas WT durante las primeras

24 h de estrés salino (100 mM NaCl). Mientras que la expresión de *SIWAK3* se mantiene constante a lo largo del periodo de tratamiento, el gen *SIWAK2* reduce su expresión rápidamente (un 50 % en las 2 primeras h de tratamiento) y continúa la tendencia a decrecer durante las 24 h, donde alcanza un 80% de reducción respecto al control (**Figura 50**).

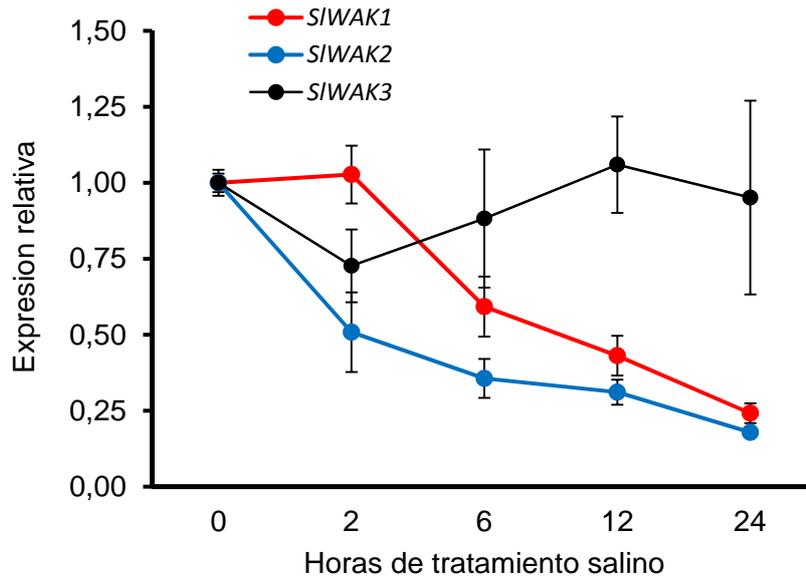


Figura 50. Expresión relativa del gen *SIWAK1* y los genes flanqueantes *SIWAK2* y *SIWAK3* en raíces de plantas WT durante 24 h de tratamiento salino (100 mM NaCl). Se representan los valores medios obtenidos para 2 experimentos independientes (n=6) \pm ES. Eficiencia de la pareja de cebadores usados: *SIWAK1*, e=0,99, *SIWAK2*, e=1,13, *SIWAK3*, e=1,03.

El gen *SIWAK1* muestra una tendencia similar a los cambios inducidos por la salinidad en *SIWAK2*, aunque el efecto es posterior ya que permanece constante durante las 2 primeras h y es a partir de ese tiempo de tratamiento cuando se reduce la expresión de *SIWAK1* con la salinidad, alcanzando un porcentaje de reducción similar al de *SIWAK2* a las 24 h de tratamiento. En resumen, los dos primeros genes del clúster *WAK* de tomate se inhiben tras la imposición del estrés salino, etapa que corresponde fundamentalmente al efecto osmótico en tomate.

4. El gen *SIWAK1* está anulado en el mutante pero no los genes flanqueantes *SIWAK2* y *SIWAK3*

En tres diferentes experimentos se ha analizado la expresión del gen *SIWAK1* en el mutante, y en todos ellos se observó que la expresión del gen *SIWAK1* está anulada no solo en la parte aérea, como se observa en el WT, sino también en raíz, lo que indica que es un mutante nulo. Al presentarse el gen *SIWAK1* dentro de un clúster de isoformas, se procedió a analizar la expresión de los genes flanqueantes *SIWAK2* y *SIWAK3* en raíces de plantas WT y mutante desarrolladas en medio salino (200 mM NaCl) durante 8 días (**Figura 51**) con el fin de determinar si la expresión de dichos genes se ve afectada por la presencia del inserto de T-DNA.

En primer lugar, se presenta en la **figura 51** la evolución temporal del gen *SIWAK1* en raíces de WT (en el mutante estaba anulada). Los resultados de expresión muestran la misma tendencia que aquellos obtenidos a corto plazo y menor nivel de estrés (**Figura 50**), ya que el tratamiento salino reduce la expresión de *SIWAK1* a lo largo del periodo de tratamiento (8 días). Estos resultados confirman que el estrés salino provoca en tomate una importante reducción en la cantidad de transcrito del gen *SIWAK1*.

Respecto a los cambios inducidos por la salinidad en la expresión del gen flanqueante *SIWAK2*, la reducción en el nivel de expresión de las raíces del WT es más brusca que la que tiene lugar en el gen *SIWAK1*, ya que prácticamente se anula la expresión desde los 2 días de tratamiento, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos a más corto plazo ya que este gen era el primero que reducía su expresión con la salinidad. En el mutante *wak1* se encontró expresión del gen *SIWAK2* en raíz, aunque su nivel de expresión era un 40% menor que el de WT antes de aplicar la sal (**Figura 51**). Sin embargo, la expresión quedaba prácticamente anulada con la salinidad de manera similar a la respuesta observada en WT.

La expresión del otro gen flanqueante, *SIWAK3*, que no estaba afectada por la salinidad a corto plazo en las raíces de las plantas WT, era la menos afectada a largo plazo, con una reducción alrededor del 50% entre los 2 días y 8 días de

tratamiento salino. De nuevo, en el mutante *wak1* se observó una tendencia a reducir la expresión del gen *SIWAK3* respecto al WT el día 0, como se observó para *SIWAK2*, tendencia que se mantenía a los 2 días de tratamiento y alcanzando después los mismos niveles que el WT.

Considerados en conjunto, la expresión de los genes WAKs de tomate se reduce con la salinidad. *SIWAK2* es el gen que más rápidamente reduce su expresión con la salinidad, tanto en WT como en el mutante *wak1*, mientras que *SIWAK3* es el menos afectado por la salinidad.

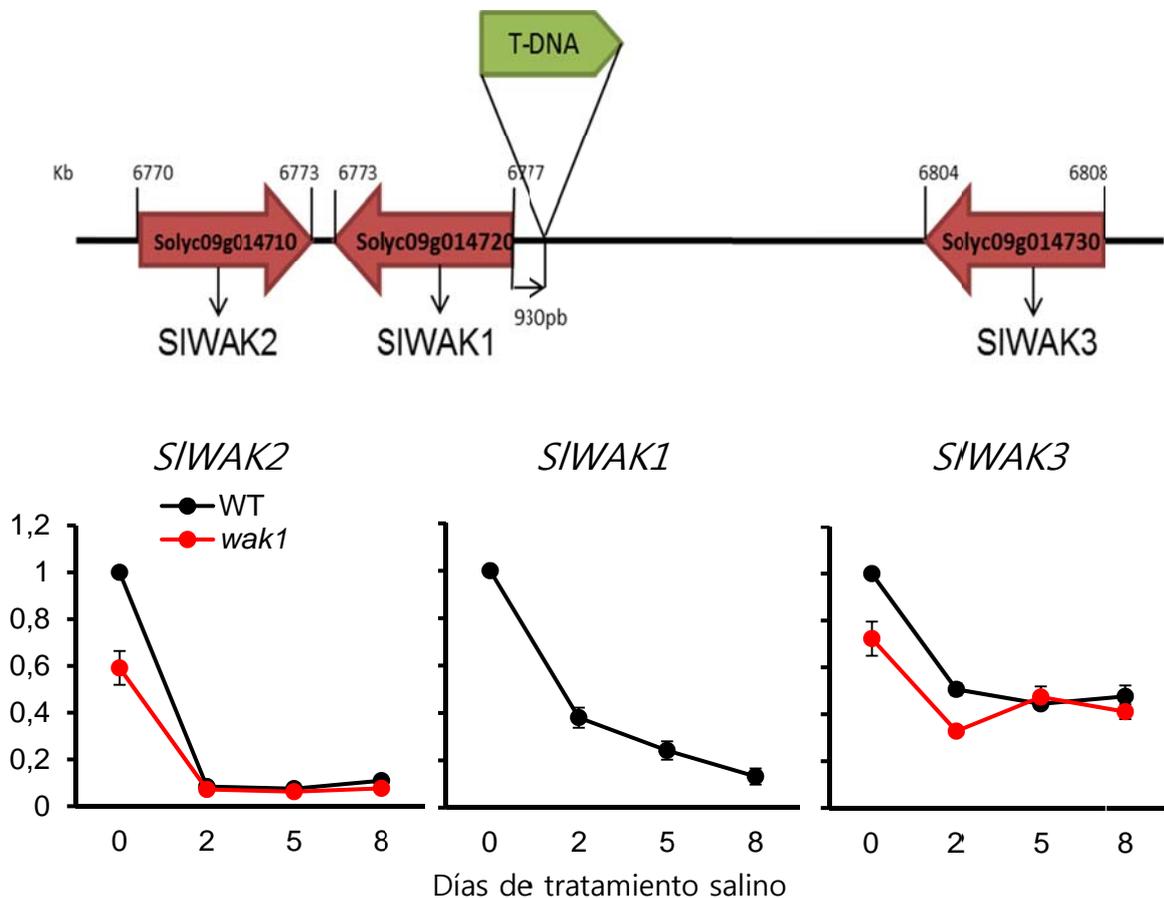


Figura 51. Expresión relativa del gen *SIWAK1* y los genes flanqueantes *SIWAK2* y *SIWAK3* en raíces de plantas WT y del mutante *wak1* durante 8 días de tratamiento salino (200 mM NaCl). Se representan los valores medios obtenidos para 2 experimentos independientes con 3 réplicas biológicas (n=5) ± ES.

5. El mutante *wak1* muestra un fenotipo sutil cuando el estrés salino se aplica a corto-medio plazo pero a largo plazo reduce el rendimiento en fruto

Se han llevado a cabo diferentes experimentos a corto y medio plazo en condiciones controladas, donde las plantas se desarrollan en cultivo hidropónico, y el tratamiento salino (200mM NaCl) se aplicaba al estado de desarrollo de seis hojas. En los diferentes ensayos (desde 5 a 14 días de tratamiento), no se han observado diferencias fenotípicas entre plantas WT y mutante en condiciones no salinas, como muestran los datos de peso de la planta y altura de parte aérea (**figuras 52C y D**).

En medio salino, el síntoma más evidente observado en el fenotipo del mutante era su menor clorosis foliar en las hojas superiores del mutante, como empieza a observarse a los 8 días y se muestra más claramente a los 14 días de tratamiento (**figuras 52A y B**).

Esto se refleja en el incremento significativo del contenido de clorofila de la primera hoja desarrollada del mutante, respecto a WT, que incrementa 10 unidades (Figura 8C). Sin embargo, respecto al desarrollo vegetativo se observó un fenotipo sutil en el mutante, con una tendencia a reducir su desarrollo respecto a WT aunque sin llegar a alcanzar diferencias significativas, excepto en la altura de la parte aérea (**figuras 52C y D**).

Puesto que los resultados a medio plazo y en condiciones controladas eran más bien contradictorios a la hora de definir el mutante como más sensible o más tolerante a la salinidad que el WT, ya que mostraba menor clorosis que WT (carácter de tolerancia) pero tiende a reducir su desarrollo vegetativo (carácter de sensibilidad), el siguiente experimento se realizó a largo plazo en el invernadero.

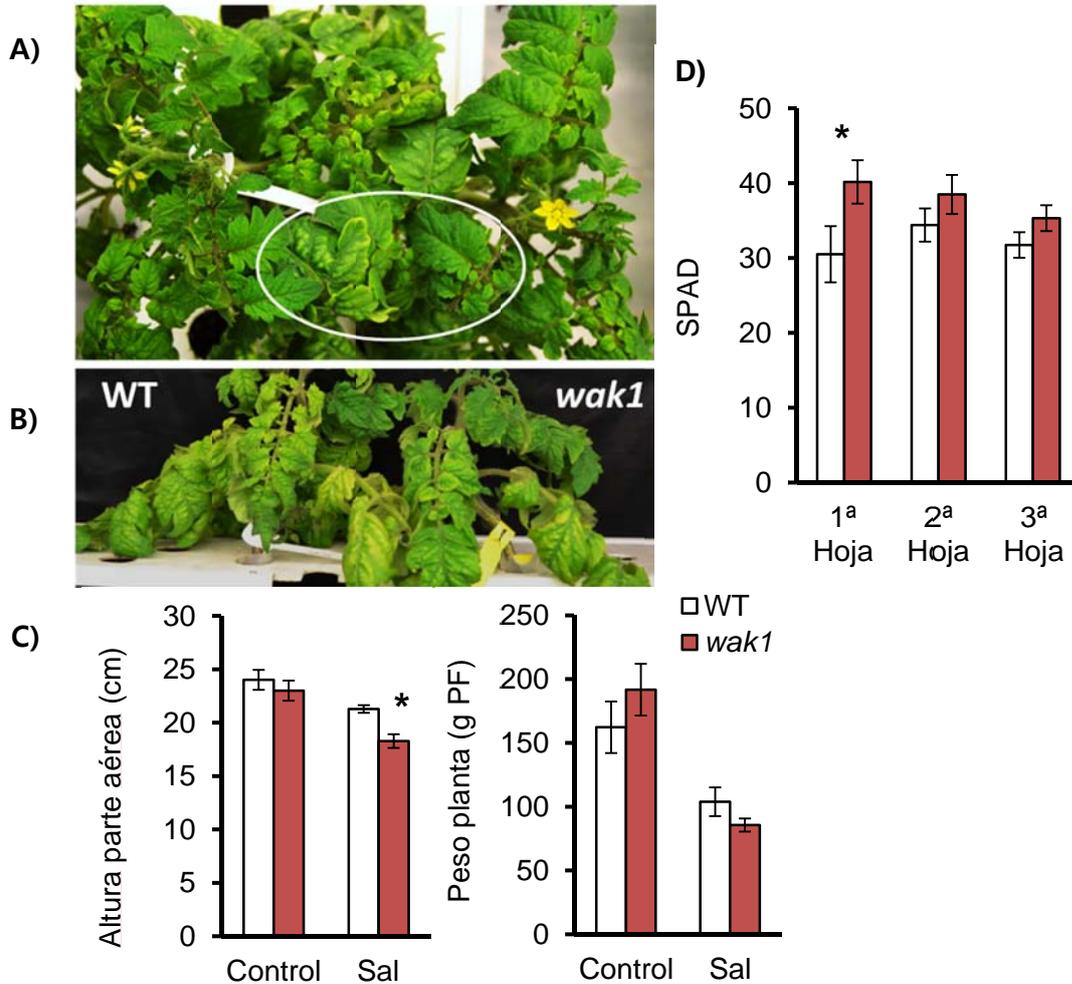


Figura 52. El mutante *wak1* muestra un fenotipo sutil en condiciones de salinidad a medio plazo aunque reduce la clorosis de las hojas superiores. Fenotipo de las plantas WT y del mutante *wak1* durante 8 días (A) y 14 días (B) de tratamiento salino (200 mM NaCl) donde se observa la menor clorosis del mutante en las hojas superiores. C) Contenido en clorofila de las 3 hojas superiores de WT y mutante después de 14 días de sal. D) Peso de la planta y altura de la parte aérea al final del experimento. Valores medios (n=5) ± ES. * Diferencias significativas entre medias (LSD 5%).

Con objeto de que las plantas pudieran llegar a producción, el tratamiento salino fue 100 mM NaCl y se aplicó durante 60 días. Aunque nuevamente se observó una tendencia a reducir la biomasa vegetativa y la altura de las plantas con la salinidad (**figuras 53A y C**), como se observa después de 25 días de tratamiento salino, el efecto negativo inducido por la salinidad en el mutante queda claramente de manifiesto en la producción (**figura 53B**).

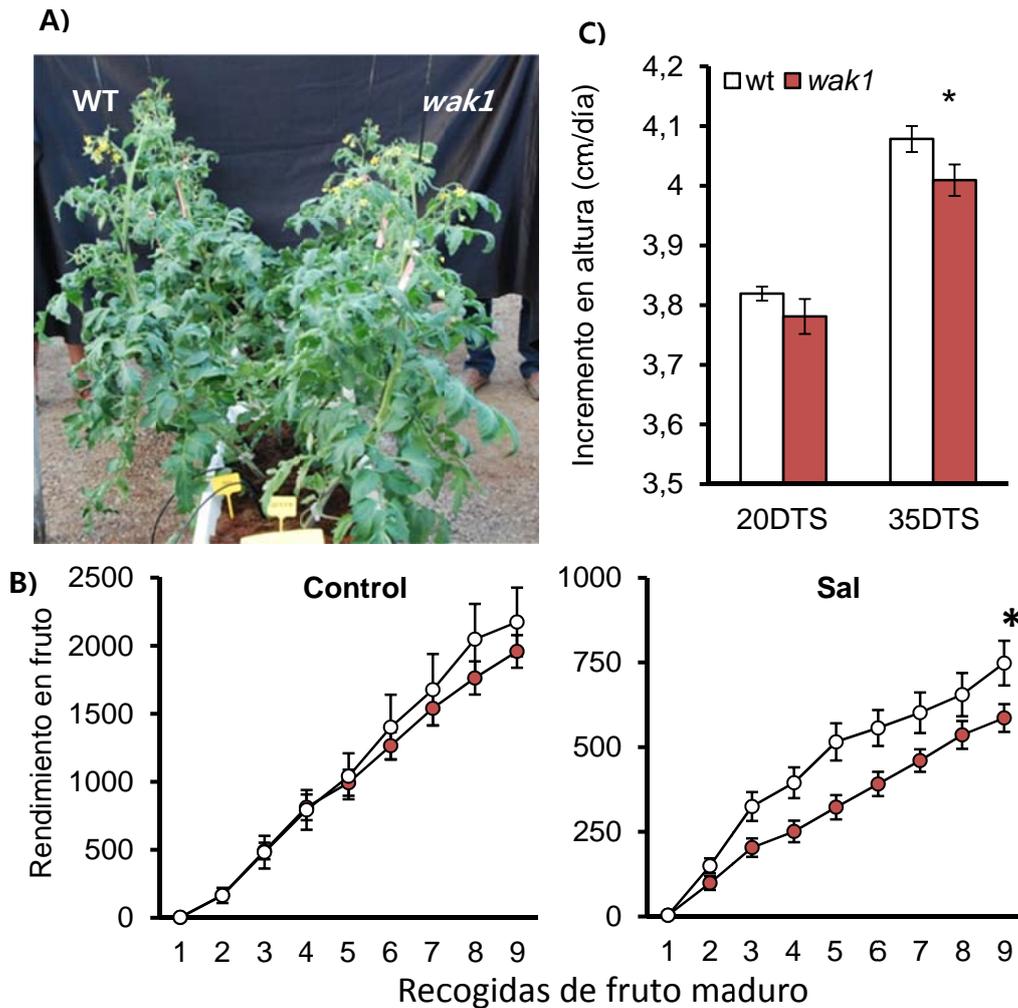


Figura 53. El efecto negativo inducido por la salinidad en el mutante *wak1* se refleja principalmente en el rendimiento en fruto. Plantas WT y mutante eran desarrolladas en invernadero y al estado de desarrollo de 8-10 hojas, en la mitad de las plantas se continuaba el riego con la solución control y la otra mitad se regaban con una solución a la que se había añadido 100 mM NaCl y se mantenía el tratamiento durante 60 días. A) Fenotipo de las plantas WT y mutante después de 25 días de tratamiento. B) Rendimiento en fruto de las plantas desarrolladas en medio no salino (control) y salino. Valores medios (n=9) \pm ES.

El rendimiento acumulado de las diferentes recogidas de frutos maduros, procedentes tanto de las plantas desarrolladas en medio no salino como salino, muestra que no hay diferencias entre plantas WT y mutante desarrolladas en medio no salino, mientras que en medio salino el rendimiento en fruto se reduce significativamente en el mutante respecto al WT durante las siete últimas recogidas de cosecha. Estos resultados demuestran que el mutante *wak1* está más afectado

por la salinidad a largo plazo, efecto que se refleja en el parámetro más importante desde un punto de vista agronómico, como es el rendimiento en fruto

6. La acumulación de Na⁺ y la relación Na⁺/K⁺ se reducen en las hojas jóvenes del mutante *wak1* en condiciones salinas

El estrés iónico es generalmente el efecto más importante inducido por la salinidad a medio-largo plazo, siendo la relación Na⁺/K⁺ un carácter asociado a la tolerancia a la salinidad en tomate (García-Abellán et al., 2015).

Con objeto de llevar a cabo la caracterización fisiológica del mutante, se midieron las concentraciones de Na⁺ y K en hoja joven, hoja adulta y raíz en dos experimentos diferentes donde las condiciones de cultivo (hidropónico) y el estado de desarrollo de las plantas eran similares; en ambos casos, al estado de desarrollo de 6 hojas verdaderas se les aplicó el tratamiento salino (200 mM de NaCl), y las concentraciones se midieron después de un periodo de tiempo suficiente para que el efecto iónico pueda ser tan importante o más que el estrés osmótico inducido por la salinidad (Muñoz-Mayor et al., 2012).

A los 8 días de tratamiento (1º experimento), la concentración de Na⁺ aumentaba en la raíz del mutante, respecto a WT, y disminuía en hoja adulta y, especialmente, en hoja joven donde se reducía más de un 60% respecto a la concentración del WT (**figura 54A**).

Los cambios en la relación Na⁺/K⁺ se debían fundamentalmente a Na⁺, ya que no había cambios significativos en las concentraciones de K⁺ (datos no mostrados). Así, el mutante *wak1* se caracteriza por una relación Na⁺/K⁺ en hoja joven mucho menor que en WT, siendo este carácter relacionado con la tolerancia a la salinidad.

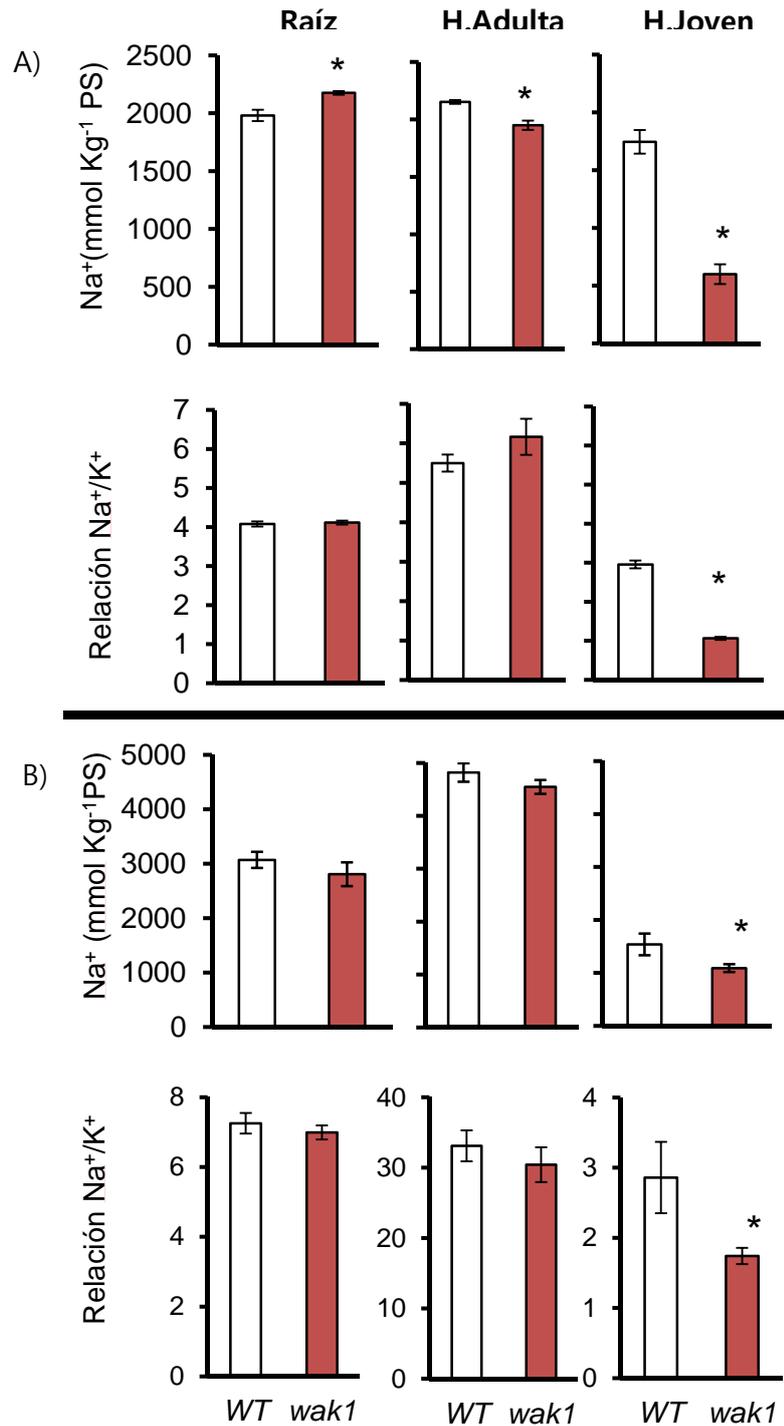


Figura 54. La acumulación de Na⁺ y la relación Na⁺/K⁺ se reduce en hojas jóvenes del mutante *wak1* en condiciones salinas. Plantas WT y mutantes eran desarrolladas durante 8 días (A) y 14 días (B) de tratamiento salino (200 mM NaCl) y los contenidos iónicos eran analizados en raíz, hoja adulta y hoja joven. Los resultados corresponden a dos experimentos diferentes. Valores medios (n=5) ± ES. * Diferencias significativas entre medias (LSD 5%).

En orden a comprobar si se mantenía la respuesta del mutante al aumentar el periodo de tratamiento, el 2º experimento se prolongó hasta 14 días de tratamiento (200 mM NaCl) y se midieron las concentraciones de Na⁺ y K⁺ en las mismas partes de la planta (**figura 54B**). Las diferencias observadas en raíz y hoja adulta no se mantienen al aumentar el periodo de tratamiento, mientras que la acumulación de Na⁺ en hoja joven del mutante continúa siendo significativamente menor que en WT, y ello a pesar de los altos niveles de Na⁺ que llegan a alcanzarse en raíz y, especialmente, en hoja adulta. Además, la relación Na⁺/K⁺ se reduce un 40% en hoja joven del mutante respecto a WT. Estos resultados indican que el mutante *wak1* es tolerante al estrés iónico inducido por la salinidad, reflejado por una menor acumulación del ion tóxico Na⁺ en hoja joven. Además, es coherente con los mayores niveles de clorofila detectados en la hoja superior del mutante después de 14 días de tratamiento (**figura 52D**), como la clorosis en las hojas es el primer síntoma indicativo del grado de toxicidad iónica.

El menor transporte de Na⁺ podría estar relacionado con mayores niveles de expresión de los principales genes implicados en el transporte de Na⁺ desde la raíz a la parte aérea, *S/SOS1* y las dos isoformas *S/HKT1* en tomate (Asins et al., 2013). La expresión relativa de estos genes se analizó en raíces de plantas tratadas durante 6 h con 200 mM NaCl (corto plazo) y después de 5 días de tratamiento (**tabla 24**).

	Control	6h 100mM	5d 200mM
<i>SOS1</i>	1,18 ±,1800	0,77 ±,7700	1,1 ±,1700
<i>HKT1.1</i>	0,48 ±,48.1	1,18 ±,18.1	1,05 ±,05.1
<i>HKT1.2</i>	1,30 ±,30.2	1,08 ±,08.2	0,80 ±,80 2

Tabla 25. La expresión relativa de los principales genes implicados en el transporte de Na⁺ desde la raíz a la parte aérea no se ve afectada en el mutante *wak1* en condiciones salinas. Se muestran los datos obtenidos para el mutante *wak1* tomando como referencia relativa (WT=1) los valores obtenidos para WT en los diferentes muestreos (0h, 6h, 5d) Plantas WT y mutantes eran desarrolladas a 200 mM NaCl y la expresión de los genes *S/SOS1* y las dos isoformas *S/HKT1* eran analizadas en raíces a corto plazo (6 h) y medio plazo (5 días de tratamiento). Los resultados corresponden a dos experimentos diferentes. Valores medios (n=3) ± ES.

Los resultados muestran que no hay cambios en la expresión de genes implicados en el transporte de Na^+ por la anulación del gen *S/WAK1* ni a corto ni a medio plazo, lo que sugiere que el menor transporte de Na^+ a la hoja joven debe estar causado por una menor capacidad del mutante para transportar solutos hasta las hojas.

7. El mutante *wak1* muestra menor tolerancia al estrés osmótico inducido por la salinidad

Ante el estrés osmótico provocado por la salinidad, la planta debe responder de manera rápida evitando la deshidratación. Por tanto, en primer lugar se midió el contenido de agua en las diferentes partes de la planta, hoja joven y adulta y raíz, a los 5 días de tratamiento salino (200 mM NaCl) y en un 2º ensayo se midió a largo plazo (14 días de tratamiento).

En condiciones control, los contenidos de agua son similares en hojas jóvenes y adultas de WT y mutante, pero en raíz el mutante muestra un contenido de agua significativamente menor que el WT (**figura 55A**), lo que sugiere una menor capacidad de absorción de agua por la raíz en el mutante. A los 5 días de tratamiento salino, no hay diferencias entre WT y mutante en los contenidos de agua en hoja adulta y raíz y, sin embargo, se observa una reducción del 38% en el contenido de agua de la hoja joven del mutante, respecto a WT (**figura 55A**). Estos resultados indican que el mutante no es capaz de evitar la deshidratación de las hojas en desarrollo en medio salino, lo que sugiere que el mutante es más sensible al estrés osmótico inducido por la salinidad.

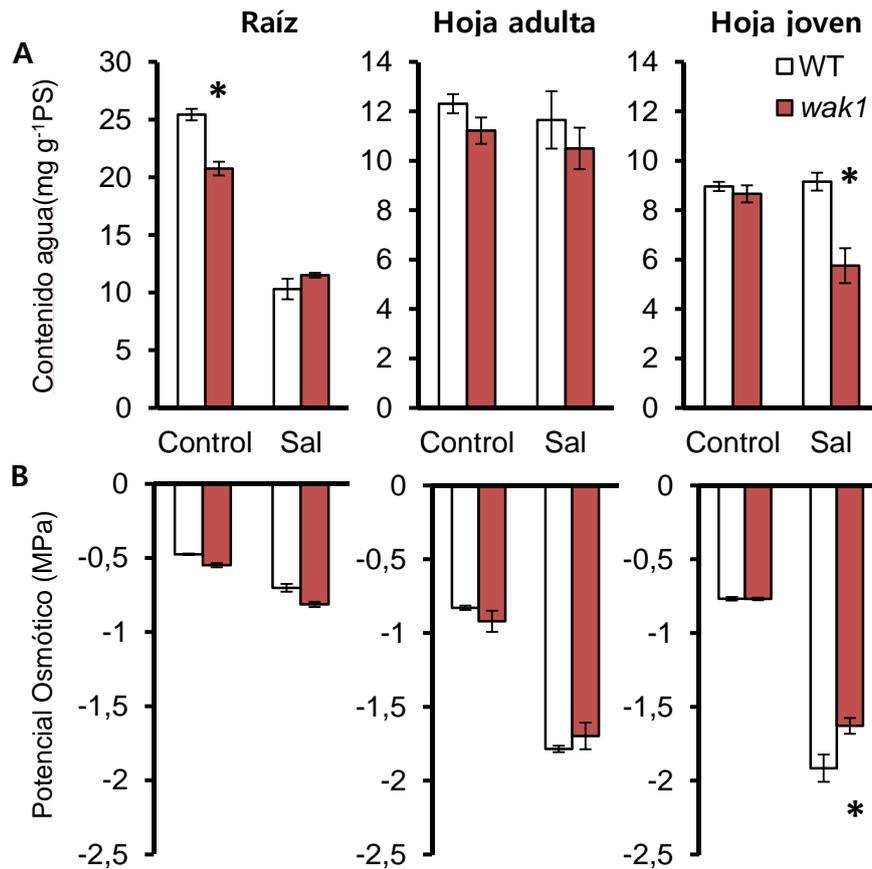


Figura 55. La hoja joven del mutante *wak1* muestra una mayor deshidratación y menor reducción del potencial osmótico desde los primeros días de estrés salino. Plantas WT y mutantes eran desarrolladas durante 5 días de tratamiento salino (200 mM NaCl) y los contenidos de agua (A) y potencial osmótico (B) eran analizados en raíz, hoja adulta y hoja joven. Valores medios (n=5) ± ES. * Diferencias significativas entre medias (LSD 5%).

Ante el bajo potencial hídrico del medio en condiciones salinas, uno de los mecanismos de la planta para evitar la deshidratación es la reducción del potencial osmótico (ψ_s) por acumulación de solutos. Las medidas de ψ_s en las tres partes de la planta (**figura 55B**) demuestran que es de nuevo la hoja joven del mutante la que está más afectada por el estrés, ya que reduce menos su ψ_s en medio salino que el WT, y ello a pesar de que hay un efecto de concentración de solutos debido a su reducción del contenido de agua. Estos resultados son coherentes con la menor acumulación de Na^+ encontrada especialmente en las hojas jóvenes del mutante, ya que hay que tener en cuenta que la reducción de ψ_s en medio salino se debe principalmente a los solutos inorgánicos y, especialmente a los iones salinos.

Seguidamente, se repitió un experimento similar para comprobar si el mutante *wak1* era capaz de recuperar la homeostasis osmótica a más largo plazo (14 días a 200 mM NaCl). Los cambios en los contenidos de agua de WT y mutante muestran una tendencia similar a la observada a corto plazo, con una reducción prácticamente igual en la hoja joven del mutante (35%) pero en este experimento el contenido de agua también se reduce en las hojas adultas hasta un 15% (**figura 56A**). Estos resultados ponen de manifiesto que el gen *S/WAK1* está involucrado principalmente en la componente osmótica inducida por la salinidad.

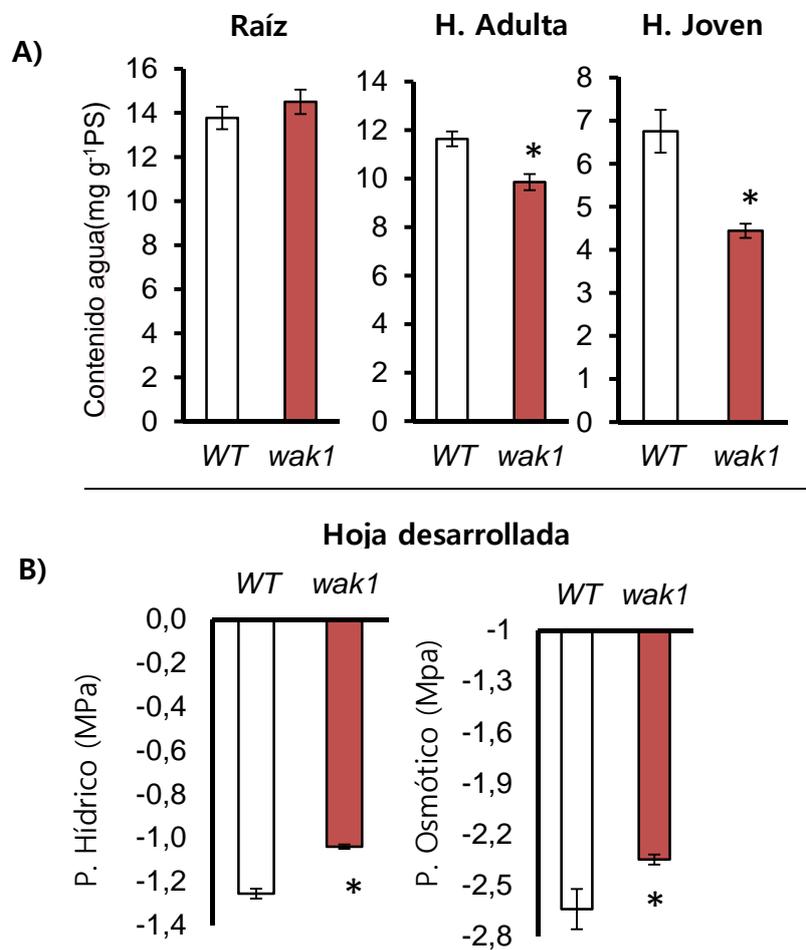


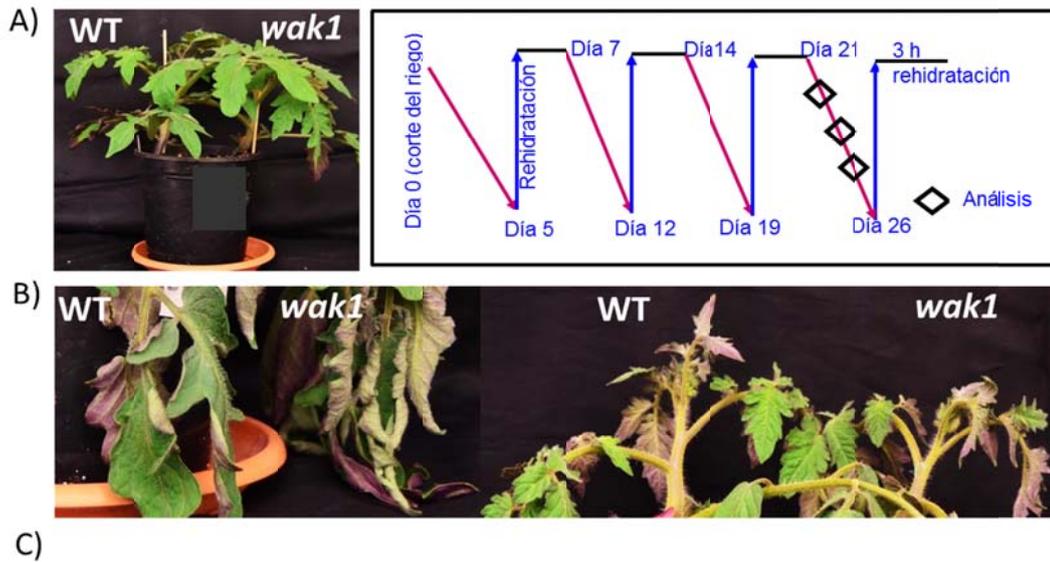
Figura 56. El mutante *wak1* es sensible al estrés osmótico inducido por la salinidad. Al estado de desarrollo de 6 hojas, se aplicó el tratamiento salino (200 mM NaCl) a plantas WT y mutante durante 14 días. A) Contenidos de agua en raíz, hoja adulta (4-5ª hojas) y hoja joven. B) Potenciales hídrico y osmótico en la 2-3ª hojas completamente desarrolladas. Valores medios (n=5) ± ES. *Diferencias significativas entre medias (LSD 5%).

En este experimento también se analizaron los potenciales hídrico y osmótico (ψ_h y ψ_s) en las dos hojas inmediatamente superiores (2-3ª) a las utilizadas para el contenido de agua (**figura 56B**). Efectivamente, el mutante reduce alrededor de un 20% ambos potenciales respecto al WT, lo que corrobora que la deshidratación en medio salino se debe a la menor capacidad de acumular solutos para reducir ψ_s en las hojas del mutante.

8. La respuesta del mutante *wak1* al estrés hídrico confirma su menor tolerancia al estrés osmótico

Los estreses hídrico y salino comparten el estrés osmótico, puesto que la disminución en la disponibilidad de agua del medio bajo condiciones de sequía o la disminución en el potencial hídrico de la solución del suelo bajo salinidad causan un estrés osmótico, el cual conduce a una menor absorción de agua por la planta y pérdida de turgor. Después de la caracterización del mutante *wak1* en medio salino, se consideró interesante estudiar la respuesta del mutante *wak1* al estrés hídrico con la finalidad de corroborar que el gen *SIWAK1* está implicado en la homeostasis osmótica, ya que en condiciones salinas la planta debe recuperar ambas, la homeostasis iónica y osmótica.

La respuesta al estrés hídrico de WT y mutante se evaluó en maceta, en sistema 2 a 2 donde se enfrenta una planta WT y una mutante para que las plantas estén bajo las mismas condiciones de humedad del sustrato, y se aplicaron 4 ciclos de deshidratación-rehidratación (**figura 57A**). A lo largo del ensayo se realizó un seguimiento del fenotipo de las plantas y al final se tomaron los datos de desarrollo de las plantas. Respecto al fenotipo, se observó que el grado de deshidratación era mayor en el mutante que en el WT, tanto en la parte más joven de la planta como en las hojas basales (**figura 57B**). Los cambios inducidos por el estrés hídrico en los parámetros de desarrollo mostraban una tendencia similar a la observada en las plantas sometidas a estrés salino, como el mutante tiende a reducir su desarrollo aunque solo se alcancen diferencias significativas en el número de hojas (**figura 57C**).



	P. aérea (g PF)	Raíz (g PF)	Altura P. aérea(cm)	Nº hojas
WT	88,20 ± 5.26	1,36 ± 0.09	28,53 ± 0.84	11,20 ± 0.20
wak1	83,28 ± 5.85	1,24 ± 0.10	27,36 ± 0.95	10,40 ± 0.27*

Figura 57. El mutante *wak1* es sensible al estrés osmótico inducido por estrés hídrico. A) Cada maceta contiene una planta WT y otra mutante para que no haya diferencia alguna en el estado hídrico del sustrato y las diferencias se deban exclusivamente a las líneas. A la derecha se muestra el esquema experimental utilizado en este ensayo donde las plantas eran sometidas a cuatro ciclos sucesivos de deshidratación y el cese del riego se inició al estado de desarrollo de 4 hojas verdaderas. B) Fotos representativas del 4º día de deshidratación donde se observa el mayor grado de deshidratación del mutante tanto en las hojas basales como en la parte apical. C) Parámetros de desarrollo medidos al final de los cuatro ciclos más la rehidratación. Valores medios (n=5) ± ES. *Diferencias significativas entre medias (LSD 5%).

Las dos respuestas fisiológicas de las plantas ante una situación de sequía son: acumular solutos en las hojas para reducir su potencial osmótico, y así la planta poder continuar transportando agua hasta las hojas, o bien reducir la pérdida de agua por las hojas vía transpiración, aunque ambas estrategias pueden actuar conjuntamente. En este ensayo se analizaron ambas estrategias de tolerancia. Se midió el contenido de agua y los potenciales hídrico (ψ_h) y osmótico (ψ_s) en la

4ª hoja completamente desarrollada de plantas WT y mutante. Las medidas se hicieron a los 3 días de cortar el riego durante el 3º ciclo de deshidratación, antes de la aparición de signos evidentes de deshidratación (**figura 58A**). El contenido de agua se reduce significativamente a los 3 días de deshidratación en la hoja del mutante, respecto al WT, es decir muestra una respuesta similar a la observada en condiciones de salinidad. En los cambios de ψ_h y ψ_s también se observa una clara tendencia a la menor reducción de ψ_s en el mutante, resultando en una reducción significativa del potencial de turgor de la hoja del mutante, respecto a WT, calculado a partir de ψ_h y ψ_s . Estos resultados sugieren que el mayor grado de deshidratación observado en el mutante se debe a su menor tolerancia al estrés osmótico provocado por la deshidratación, de manera similar a la respuesta observada en condiciones salinas.

Respecto a la capacidad para evitar la pérdida de agua por las hojas ante una situación de estrés hídrico, en este ensayo se analizó en dos fases la pérdida de agua de hojas escindidas (4ª hoja) procedentes de plantas control, una a corto plazo correspondiente a las primeras 8 horas y otra a largo plazo comprendida entre 1 y 6 días (**Figura 58B**). Los valores de pérdida de agua son idénticos en WT y mutante. Según estos resultados, la mayor deshidratación de las hojas del mutante no está asociada con una mayor pérdida de agua en condiciones de estrés.

Con el objetivo de corroborar que la mutación no altera la pérdida de agua a través de una mayor transpiración, en la 3ª hoja desarrollada se siguió la evolución de la conductancia estomática (g_s) y transpiración (E) a lo largo del 4º ciclo de deshidratación. En la **figura 59** se muestran los valores medios no solo durante el ciclo de deshidratación sino también durante la etapa de recuperación. Puesto que las hojas de WT y mutante muestran el mismo grado de reducción de g_s y E durante todo el periodo de deshidratación-rehidratación, se puede concluir que la mutación del gen *SIWAKI* no altera la pérdida de agua transpiracional y, por tanto, la menor tolerancia del mutante está asociada con la menor capacidad para mantener el turgor en condiciones de estrés hídrico, debido fundamentalmente a la menor capacidad para reducir el potencial osmótico.

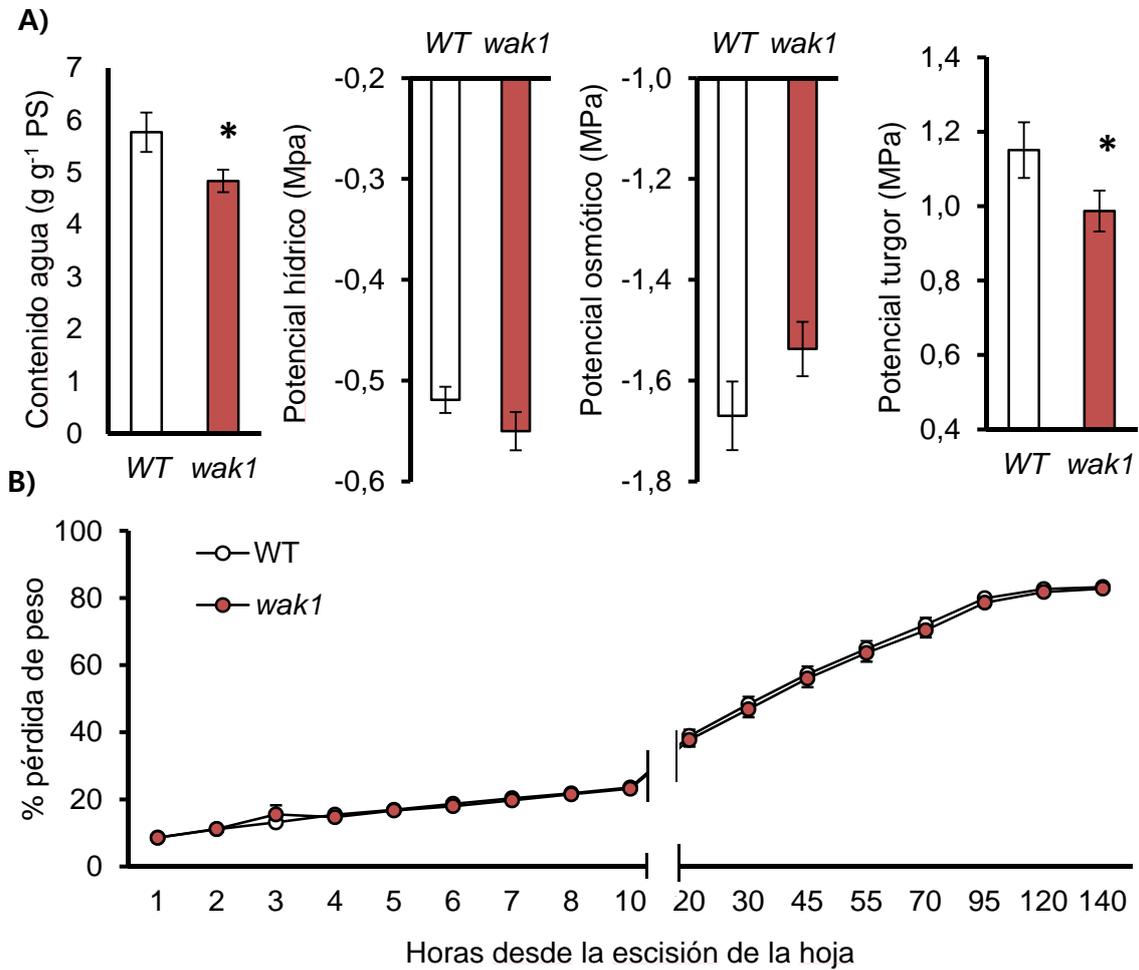


Figura 58. La mayor deshidratación de las hojas del mutante *wak1* está asociada al menor turgor de las plantas sometidas a estrés hídrico. A) Contenido de agua y potenciales hídrico, osmótico y de turgor en la 4ª hoja desarrollada de plantas WT y mutante a los 3 días de cortar el riego, antes de la aparición de signos evidentes de deshidratación (Valores medios (n=5) ± ES). * Diferencias significativas entre medias (LSD 5%). B) Evolución del porcentaje de pérdida de agua en hojas cortadas (4ª hoja) de plantas WT y mutante desarrolladas en condiciones control. La pérdida de agua se midió en dos fases, durante las primeras 8 horas desde la abscisión de las hojas y una segunda fase comprendida entre 1 y 6 días. Los valores se expresan como porcentaje de pérdida de agua relativa a cada tiempo respecto al peso fresco inicial al tiempo 0.

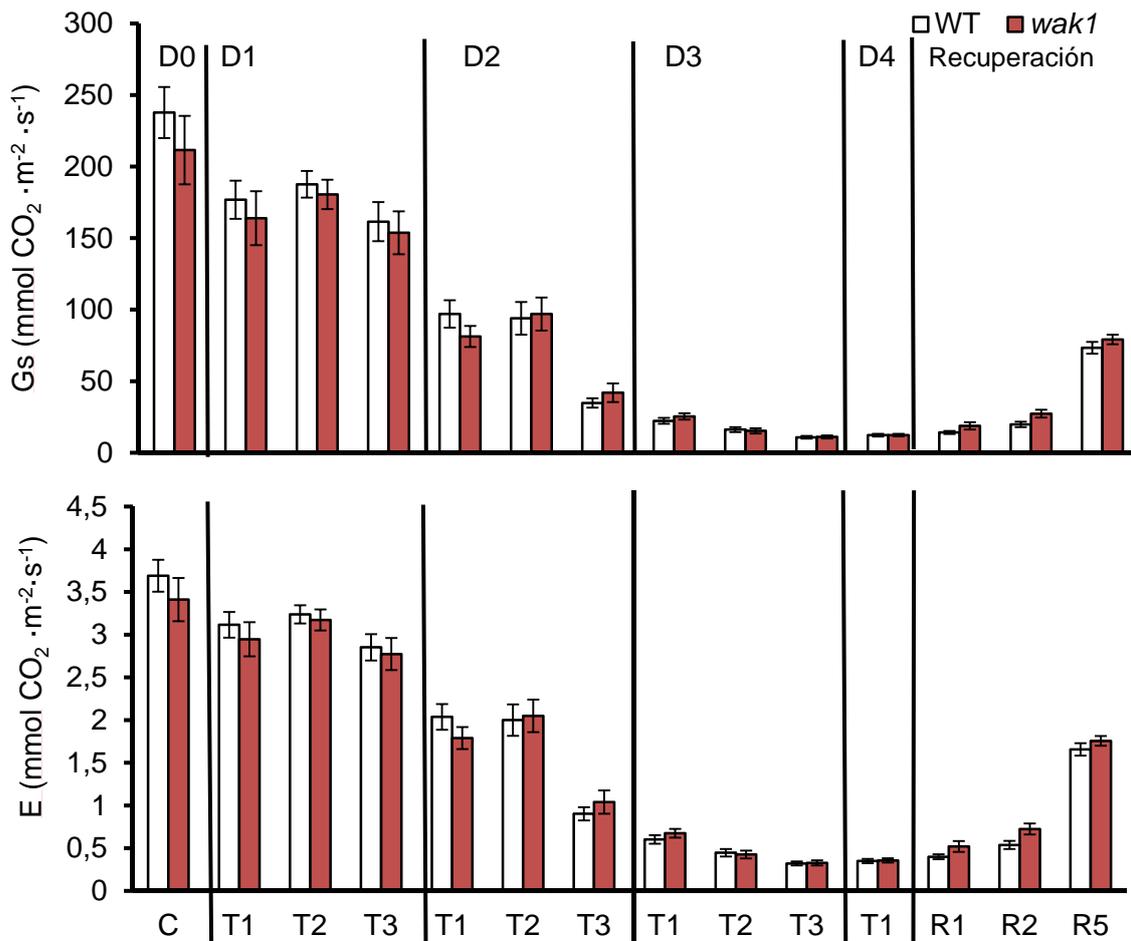


Figura 59. La mutación *S/WAK1* no altera la pérdida de agua vía transpiración en condiciones de estrés hídrico. Valores de conductancia estomática (Gs) y transpiración (E) medidos a lo largo del cuarto ciclo de deshidratación y durante la fase de recuperación en la 3ª hoja completamente desarrollada de plantas WT y mutante D0, inicio (condición estandar); D1, día 1, D2 D3 y D4 corresponden a los días sin riego. T1, T2 y T3, corresponden a las medidas tomadas en la 1ª, 2ª y 3ª hora de luz, respectivamente. En la etapa de recuperación, las medidas se tomaron en la 1ª (R1), 2ª (R2) y 5ª horas de luz (R5). (Valores medios ($n=3$) \pm ES).

9. La reducción de la tasa de desarrollo *in vitro* del mutante *wak1* está relacionada con la concentración de sales en el medio de cultivo

En el mutante de *Arabidopsis* con mayor homología al de tomate se comprobó que el mutante reducía su desarrollo al estado de plántula cuando el medio MS no era suplementado con sacarosa, siendo el fenotipo más pronunciado cuando se reducía la concentración de sales MS y, además, las plántulas recuperaban el desarrollo

cuando se transferían a medio MS suplementado con sacarosa (Kohorn et al., 2006a). Con el fin de comprobar si el mutante *wak1* muestra un comportamiento similar, plantas WT y mutante eran desarrolladas *in vitro* durante 30 días con el medio MS completo (MS) y reducido a la mitad (MS ½), sin y con sacarosa (**Figura 60**).

El desarrollo de las plántulas WT y mutante era casi tres veces menor en medio sin sacarosa, pero independientemente de la tasa de desarrollo en uno u otro caso, la reducción de la tasa de desarrollo del mutante *wak1* está relacionada con la concentración de sales del medio de cultivo pero no con la presencia o ausencia de sacarosa. Así, en MS ½ la tasa de desarrollo del mutante se reducía un 15 y 25% en medio sin y con sacarosa, respectivamente, respecto al WT. Sin embargo, cuando el medio contenía las sales MS independientemente de que llevase o no sacarosa, tasas de desarrollo similares eran encontradas en el WT y mutante. El hecho de que el desarrollo del mutante *wak1* esté relacionado con la concentración de sales MS del medio está de acuerdo con la menor capacidad del mutante para acumular solutos en condiciones de estrés.

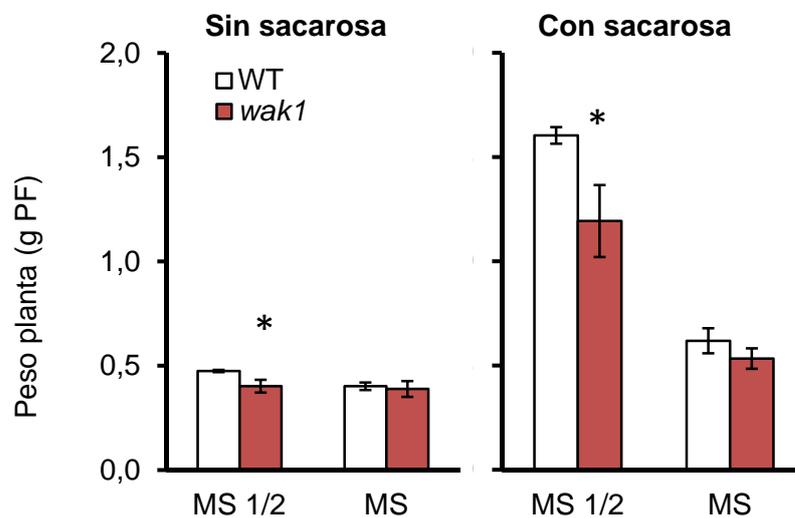


Figura 60. La reducción de la tasa de desarrollo *in vitro* del mutante *wak1* está relacionada con la concentración de sales del medio de cultivo pero no con la presencia o ausencia de sacarosa. Plantas WT y mutante eran desarrolladas *in vitro* en medio de cultivo con la concentración de sales MS reducida a la mitad (MS ½) y completa (MS) sin y con sacarosa (10 g L⁻¹). Valores medios (n=10) ± ES. *Diferencias significativas entre medias (LSD 5%).

10. El papel del gen *SWAK1* en la respuesta a estrés está relacionado con una acumulación de sacarosa en raíz

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento sobre el papel del gen *SWAK1* en tomate, se han analizado por HPLC los azúcares en raíz y hojas jóvenes y adultas de plantas WT y mutante antes de poner la sal (día 0) y después de 5 días de tratamiento salino (200 mM NaCl). En el día 0 no hay diferencias entre WT y mutante en ninguno de los azúcares analizados, mientras que a los 5 días de tratamiento el contenido de sacarosa aumenta más del 70% en la raíz del mutante, respecto a WT, lo que no se observa en hoja adulta, e incluso en hoja joven se reduce (**Figura 61**). En hexosas se observa la misma tendencia, aunque el porcentaje de aumento en raíz es mucho menor que. Respecto a inositol, hay un cambio muy significativo en el mutante, como es la reducción casi del 100% en la hoja joven, lo que no se observa en los otros órganos analizados.

Además, se ha analizado por RT-qPCR la expresión de algunos de los posibles genes implicados en el metabolismo de la sacarosa: *SITIV-1*, invertasa ácida vacuolar; *SILIN6*, invertasa ácida de pared celular; *SILINH*, Inhibidor de invertasa. El gen *SITIV1* es también conocido como *Sucrose accumulator* y está encargado de codificar una proteína localizada en la vacuola con actividad β -fructofuranosidasa que cataliza de forma reversible el paso de sacarosa a glucosa y fructosa (Elliott et al., 1993). Se selecciona este gen para analizar su expresión debido a que la actividad de esta invertasa vacuolar ha sido relacionada en *A.thaliana* con la expresión de genes WAK (Kohorn et al., 2006a). *LIN6* es una de las 4 invertasas ácidas descritas (*LIN5-8*) que codifica para una invertasa de pared celular cuya expresión se ha localizado en diferentes órganos sumideros, entre ellos la raíz y la cual juega un papel fundamental en la integración de señales metabólicas, hormonales y de vías activadas por estrés (Proels and Roitsch, 2009) por lo que también se selecciona como posible gen implicado en los cambios metabólicos descritos. Por último se selecciona *SILINH* por ser un gen que codifica para una proteína endógena inhibidora de invertasa la cual suprime la actividad invertasa en patata (Schwimmer et al., 1961) y tomate (Jin et al., 2009). Los análisis se han

realizado en raíces de plantas WT y mutante desarrolladas durante 5 días a 200 mM NaCl (Figura 62).

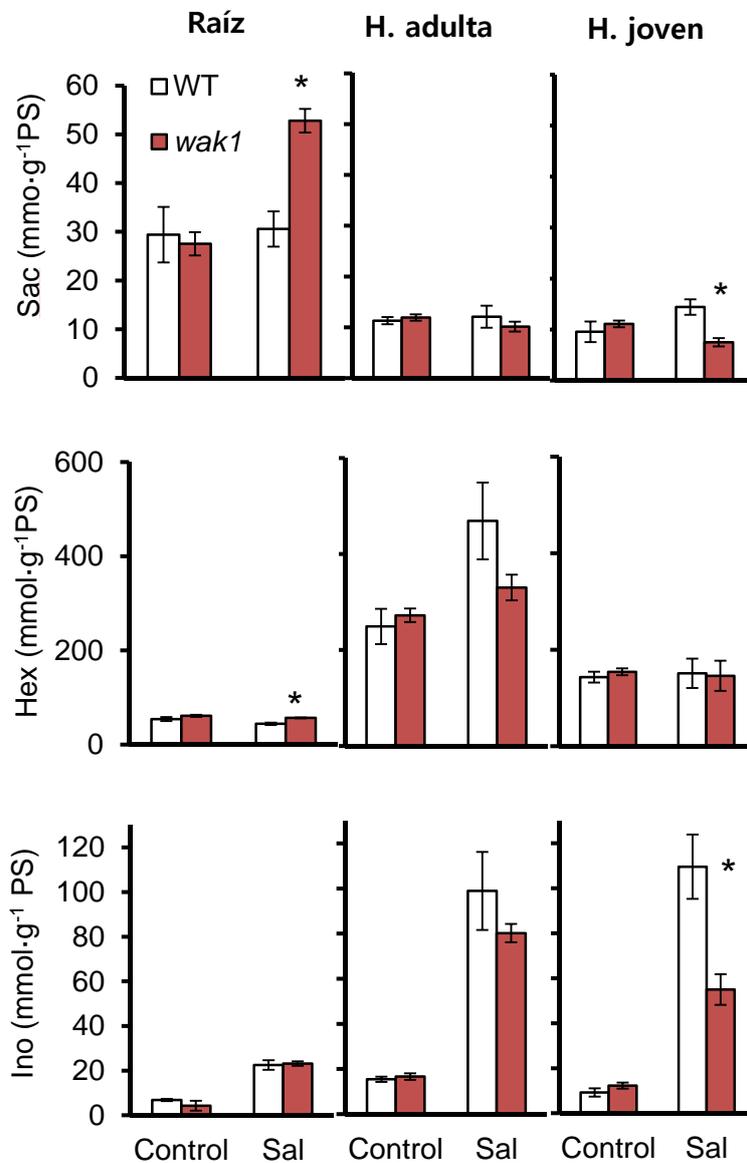


Figura 61. El mutante *wak1* muestra una alta acumulación de sacarosa en raíz y una importante reducción de inositol en hoja joven en condiciones de salinidad. Sac, Sacarosa; Hex, Hexosas (como suma de glucosa y fructosa); Ino, Inositol. Las plantas WT y mutantes eran desarrolladas durante 5 días de tratamiento salino (200 mM NaCl) y los contenidos de sacarosa (A), hexosas como la suma de glucosa y fructosa (B) e inositol (C) eran analizados en raíz, hoja adulta y hoja joven antes de aplicar la sal (control) y a los 5 días (sal). Valores medios ($n=5$) \pm ES. * Diferencias significativas entre medias (LSD 5%).

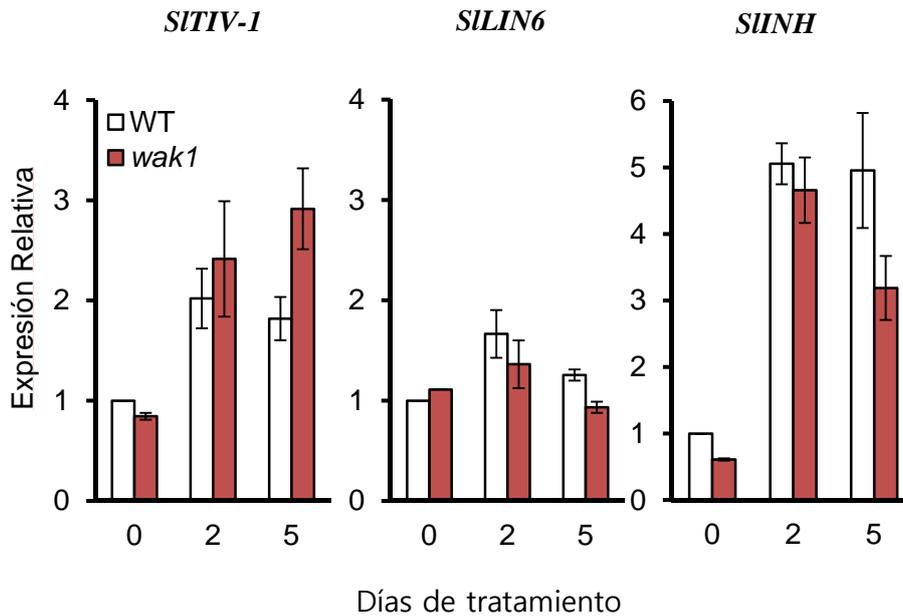


Figura 62. Análisis de expresión de genes implicados en el metabolismo de la sacarosa en raíces de plantas WT y mutante desarrolladas durante 5 días de tratamiento salino (200 mM NaCl). *SITIV-1*, invertasa vacuolar; *SILIN6*, invertasa de pared celular; *SINH*, Inhibidor de invertasa. Valores medios (n=3) \pm ES. * Diferencias significativas entre medias (LSD 5%).

No se observan diferencias entre WT y mutante a 0 y 2 días de tratamiento. Es interesante señalar el importante aumento en la expresión del gen *SITIV-1*, el principal gen implicado en la degradación de sacarosa a hexosas en la vacuola, a los 5 días de tratamiento, que es exactamente cuándo se observa el aumento de sacarosa en raíz. El otro gen que modifica su expresión es el inhibidor de invertasa *SINH*, que actúa de manera inversa reduciendo su expresión en el mutante (**figura 62**).

Finalmente, es interesante señalar que estos son los primeros resultados donde se muestra que la salinidad induce la reducción de inositol en hojas jóvenes y la acumulación de sacarosa en la raíz del mutante nulo *S/WAK1*. A ello se une que la raíz del mutante *wak1* tiene alterada la expresión de algunos de los genes implicados en el metabolismo de sacarosa en condiciones de salinidad.

Capítulo II: Discusión

11. Discusión

El papel de los genes *WAK* (*Wall-Associated Kinase*) es escasamente conocido y existen grandes divergencias entre especies (Sakamoto et al., 2012). Los genes *WAK* fueron inicialmente identificados en *A. thaliana* como un clúster génico de 30 Kb formado por 5 genes (*AtWAK1-5*) localizados en el cromosoma 1 (He et al., 1999). Posteriormente, se describieron otros 22 genes en *Arabidopsis* también agrupados en diferentes clústers distribuidos por cinco cromosomas, que se denominaron *Wall-Associated Kinase-Like* o *WAKL* (*WAKL1-WAKL22*) debido a la gran similitud con el clúster original (Verica and He, 2002, Verica et al., 2003). En arroz, se han descrito numerosos homólogos de la familia de los WAKs, contabilizándose hasta 130 genes tipo *OsWAK* divididos básicamente en dos clúster principales como consecuencia de una diversificación funcional en *Arabidopsis* y arroz, y se ha demostrado que este aumento en el número de genes no es sólo debido al mayor tamaño del genoma del arroz (Zhang et al., 2005). En la especie *Populus Tricocarpa*, un análisis *in silico* realizado recientemente ha revelado un total de 175 genes tipo *PtWAK*, siendo la mayor familia de genes de este tipo encontrada hasta la fecha, y donde el 91,5% del total de genes *PtWAK* aparecen formando duplicados en tándem (Tocquard et al., 2014), lo que parece indicar la existencia de un alto grado de redundancia génica y funcional. En cebada, un análisis bioinformático para la familia génica de los *WAKs* sugiere que podría ser muy divergente de otras especies (Zhang et al., 2005), y podría presentar múltiples genes *WAK* (Kaur et al., 2013). Estas expansiones ocurridas para los *WAKs* en otras especies pueden proveer una amplia variedad de patrones de expresión en los diferentes tejidos de la planta, como ya se demostró en *A. thaliana* (He et al., 1999).

En tomate, solo se ha estudiado hasta la fecha un gen de este tipo, identificado en un análisis transcriptómico, y denominado *SlWAK1* (Rosli et al., 2013). Según sus autores, *SlWAK1* está involucrado en la respuesta a estrés biótico. Así, el gen se induce por flagelina, *flgII-28* (que provoca un patrón molecular asociado a microbios) pero redujo su expresión en presencia de las proteínas efectoras de *Pseudomonas syringae*, AvrPto y AvrPtoB, de modo que el

silenciamiento de *SWAK1* permitió el crecimiento de *P. syringae* e incrementó los síntomas de la enfermedad. Además, Rosli et al. (2013) observaron que la proteína WAK1 de tomate se asocia con varias proteínas diferentes a las que se asocian en *A. thaliana*, sugiriendo que las proteínas WAKs en tomate no tienen un ortología clara con ninguno de los WAKs de *Arabidopsis* (Rosli et al., 2013). Previo a este trabajo, se identificó en tomate un gen que se catalogó como *LeWAK* y que codifica para una proteína tipo WAK, aunque realmente se trata de un gen tipo *WAKL14* localizado en el cromosoma 2 y que parece mediar la respuesta a la interacción raíz-parasito para la especie *Orobancha racemosa* (planta parasita) actuando como sensor de dicha interacción (Lejeune et al., 2006). El hecho de haber identificado el mutante *wak1* de tomate, que tiene anulada la expresión del gen *SWAK1*, es de gran interés para avanzar en el conocimiento sobre el papel de los genes WAKs en la tolerancia a estrés abiótico, ya que no tenemos conocimiento de que se haya realizado hasta ahora ningún estudio para tratar de dilucidar si el gen *SWAK1* está involucrado en la respuesta del tomate a estreses abióticos.

Pero antes de poder abordar la caracterización del mutante *wak1* fue necesario llegar hasta la identificación de la línea homocigota para la mutación, línea con la que se han llevado a cabo todos los ensayos de caracterización. Aunque este es el protocolo habitual en el análisis de mutantes, en este caso el proceso de identificación y selección de la línea homocigota *wak1* ha sido más complejo debido ya que la línea transgénica original contenía dos mutaciones, una mutación que era letal en homocigosis y no estaba asociada al T-DNA y la mutación que nos interesaba por estar asociada al T-DNA. Las mutaciones que no se pueden mantener en homocigosis (por ejemplo, mutaciones letales o estériles), son difíciles de abordar (Wu et al., 2015). También es mucho más complejo el proceso para llegar a la clonación del gen cuando se trata de una mutación somaclonal debida al cultivo *in vitro* o bien se ha producido por eventos de mutación espontánea (Wang and Wang, 2012). El hecho de que aparezcan mutaciones no asociadas al T-DNA se ha observado frecuentemente en diferentes programas de mutagénesis insercional (Zhang et al., 2014), como se ha descrito en el capítulo anterior.

11.1. La anulación del gen *SIWAK1* no afecta al desarrollo vegetativo ni reproductivo cuando las plantas se cultivan sin estrés

En los diferentes experimentos realizados tanto a medio como a largo plazo, en condiciones controladas y naturales (invernadero), el mutante *wak1* no muestra alteraciones en el desarrollo vegetativo ni reproductivo cuando las plantas se cultivan sin estrés (**figura 52**), siendo el fenotipo del mutante similar al del cv de tomate MoneyMaker (WT). Además, el rendimiento en fruto del mutante *wak1* no difiere con respecto al rendimiento del WT bajo condiciones naturales (**figura 53**). Estos resultados demuestran que la anulación del gen *SIWAK1* no afecta al desarrollo cuando las plantas se cultivan sin estrés. Una de las posibles causas de la inexistencia de un fenotipo obvio ante la anulación de este gen puede ser la existencia de redundancia funcional con otros genes *WAK* (Diévert and Clark, 2004, Shiu and Bleecker, 2001, Shpak et al., 2003). Así, el silenciamiento de forma individual de los genes *WAK1* y *WAK2* de *Arabidopsis* no causó ninguna alteración fenotípica (Wagner and Kohorn, 2001), mientras que la anulación conjunta de los genes *AtWAK1-5* determinó la pérdida de la expansión de células y un fenotipo enano (Wagner and Kohorn, 2001, Lally et al., 2001), así como la muerte tras el tratamiento con ácido salicílico (He et al., 1998).

Por tanto, un problema importante a la hora de estudiar el papel de los genes *WAK* ha sido la dificultad para detectar diferencias fenotípicas en líneas individuales de pérdida de función génica (Johnson and Ingram, 2005), lo que ha conducido a tratar de utilizar enfoques alternativos para el esclarecimiento de su función (Brutus et al., 2010). En este estudio, el mutante tiene anulada la expresión del gen *SIWAK1* en raíz, sin embargo si se observa expresión de los genes flanqueantes *SIWAK2* y *SIWAK3* (**figura 51**), lo que podría explicar que el desarrollo del mutante sea similar al del WT en condiciones sin estrés.

La expresión del gen *SIWAK1* es específica de raíz, ya que no se ha encontrado expresión en ningún otro órgano ni vegetativo ni reproductivo de las plantas del WT. En otras especies, se han identificado genes *WAKs* que se expresan también solo en raíz, como el gen de cebada *HvWAK1* (Kaur et al., 2013) y el de

arroz *OsWAK1* (Li et al., 2009). Este último no parece jugar un papel importante en el desarrollo, como ocurre en el gen de tomate *S/WAK1*, mientras que *HvWAK1* está implicado en la regulación del crecimiento radicular (Kaur et al., 2013). Considerados en conjunto, estos resultados ponen de manifiesto el diferente papel de los genes *WAKs* en la elongación celular y en el desarrollo de la planta.

11.2. El gen *S/WAK1* está involucrado en la tolerancia del tomate a la salinidad

Respecto a la respuesta a estrés abiótico, nuestros resultados demuestran que el mutante *wak1* solo muestra un fenotipo sutil a medio plazo cuando las plantas se desarrollan en condiciones de estrés salino e hídrico, caracterizado por presentar un crecimiento más lento, reflejado en menor altura de las plantas o menor número de hojas, pero sin llegar a reducir significativamente la biomasa vegetativa de las plantas respecto al WT (**figuras 52C, 53^a y C, y 57C**). El fenotipo sutil observado a medio plazo en el mutante estaría de acuerdo con la importante reducción observada, hasta anularse prácticamente, la expresión del gen *S/WAK1* en las raíces de las plantas WT durante los primeros días de estrés salino (**figuras 50 y 51**). Aunque la anulación de la expresión de *S/WAK1* en las raíces del WT podría verse compensada por una mayor expresión de los genes flanqueantes (*S/WAK2* y *S/WAK3*), sin embargo esto no ocurre así y, además, los cambios de expresión de ambos genes con la salinidad son similares en WT y mutante (**figuras 50 y 51**).

Sin embargo, a largo plazo queda de manifiesto la menor tolerancia del mutante al estrés salino reflejado en una disminución significativa del rendimiento en fruto (**figura 53B**), el parámetro más importante desde un punto de vista agronómico. Probablemente, debido a que la información generada sobre las posibles funciones de esta familia de genes se ha centrado en estudios a corto plazo, dirigidos principalmente a estudiar los mecanismo y vías de regulación en los que pueden estar implicados estos genes, hasta ahora no se había descrito el importante papel que pueden tener los genes *WAK* en la tolerancia a largo plazo, tal como queda demostrado en el mutante nulo *wak1*, lo que convierte a este

mutante en una herramienta ideal para avanzar en el papel de los genes *WAK* en la tolerancia a estreses abióticos en tomate.

Un aspecto que refleja el diferente papel que pueden tener los genes *WAK* es la respuesta *in vitro* en medio sin y con sacarosa. En el mutante de *Arabidopsis* con mayor homología al de tomate (que tiene anulada la expresión de *AtWAK2*), se comprobó que el mutante reducía su desarrollo al estado de plántula cuando el medio MS no era suplementado con sacarosa (Kohorn et al., 2006b). Sin embargo, los datos obtenidos en un experimento similar en este trabajo muestran que la reducción de la tasa de desarrollo del mutante *wak1* está relacionada con la concentración de sales del medio de cultivo, pero no con la presencia o ausencia de sacarosa (**figura 60**). Esta diferencia en las respuestas podría ser debida a diferencias intrínsecas entre ambas especies, *Arabidopsis* y tomate, o a diferencias funcionales entre las proteínas *AtWAK2* y *SIWAK1*. Por otra parte, el hecho de que el desarrollo del mutante *wak1* esté relacionado con la concentración de sales MS del medio de cultivo podría deberse a una menor capacidad del mutante para acumular solutos en condiciones de estrés, como se indicará más adelante.

11.3. El mutante *wak1* es tolerante al estrés iónico inducido por salinidad

El efecto específico inducido por la salinidad es la toxicidad iónica provocada por la acumulación de iones salinos, especialmente Na^+ (Hasegawa, 2013, Maathuis, 2014). En tomate, numerosos estudios demuestran la importancia que tiene la capacidad de regulación del transporte de Na^+ desde la raíz a la parte aérea en la tolerancia a la salinidad, especialmente a largo plazo, reduciendo la acumulación de Na^+ en las hojas fotosintéticamente activas (Olías et al., 2009, García-Abellan et al., 2014). En el mutante *wak1* se ha comprobado que la acumulación de Na^+ se reduce en hoja, especialmente en las hojas superiores después de un periodo de tratamiento salino (**figura 54**). Estos resultados indican que el mutante es tolerante al estrés iónico inducido por la salinidad, lo que se refleja en un mayor contenido de clorofila en las hojas superiores en comparación con el WT (**figura 52D**). La siguiente cuestión a dilucidar era si la anulación del gen *SIWAK1* altera la expresión de los genes

involucrados en la absorción y transporte de Na^+ a la parte aérea. Los análisis de expresión de los genes *S/SOS1* y las dos isoformas de *S/HKT1*, los principales genes implicados en la homeostasis de Na^+ (Olías et al., 2009, Asins et al., 2013), no mostraron cambios debidos a la anulación del gen *S/WAK1* (**tabla 25**), lo que indica que la menor acumulación de Na^+ en hoja del mutante no está asociada a procesos transcripcionales en los que están implicados estos tres genes específicamente.

Una menor relación Na^+/K^+ es un carácter fisiológico asociado a la tolerancia a la salinidad en tomate (Garcia-Abellan et al., 2015). Sin embargo, a pesar de que el mutante tenía una menor relación Na^+/K^+ que el WT en las hojas superiores (**figura 54**), el mutante mostraba mayor sensibilidad a la sal en base al rendimiento en fruto, lo que sugiere que otros procesos deben estar afectando al desarrollo del mutante a largo plazo. En estudios previos hemos comprobado que genotipos de tomate con alta capacidad de exclusión de Na^+ pueden mostrar mayor sensibilidad a la sal que otros genotipos que tienden a acumular mayores concentraciones de Na^+ en hojas (Estañ et al., 2005). Un claro ejemplo es la sobreexpresión en tomate del gen *HAL1* implicado en la homeostasis de Na^+ , donde las líneas con niveles de expresión medios o bien las plantas heterocigotas mostraban mayor tolerancia a la salinidad debido a la capacidad para regular el transporte de Na^+ a la parte aérea (Gisbert et al., 2000, Rus et al., 2001). Sin embargo, cuando se estudió la respuesta de una línea homocigota con alto nivel de expresión de *HAL1* se observó la respuesta opuesta, mayor sensibilidad a la sal a largo plazo (Muñoz-Mayor et al., 2008). Así, la alta exclusión de Na^+ en las hojas inducía una mayor síntesis y acumulación de solutos orgánicos (azúcares y ácidos orgánicos) para mantener el balance osmótico, lo cual es energéticamente mucho más costoso que la acumulación de solutos inorgánicos (Muñoz-Mayor et al., 2008).

11.4. El mutante *wak1* es sensible al estrés osmótico inducido por salinidad y sequía

La salinidad y sequía comparten el estrés osmótico, puesto que la disminución de la disponibilidad de agua del medio bajo condiciones de sequía o la disminución del

potencial hídrico de la solución del suelo bajo salinidad causan un estrés osmótico, el cual conduce a una menor absorción de agua por la planta y pérdida de turgor. Aunque el efecto osmótico se ha asociado generalmente a las primeras fases de estrés, en tomate se ha comprobado que puede ser tan importante como el efecto (Muñoz-Mayor et al., 2008, Muñoz-Mayor et al., 2012). El menor contenido de agua observado en las hojas superiores del mutante cuando las plantas se desarrolla en medio salino junto con la menor capacidad para reducir su ψ_s que el WT (**figuras 55 y 56**), pone de manifiesto la sensibilidad del mutante al estrés osmótico inducido por la salinidad. Además, es interesante resaltar la gran similitud de respuestas del mutante *wak1* a los estreses salino e hídrico (**figura 57 y 58A**), puesto que en ambos casos el mutante presenta un fenotipo sutil a medio plazo, una mayor deshidratación de las hojas y una tendencia a reducir menos el potencial osmótico ante el estrés.

Frente al estrés osmótico, las plantas utilizan diferentes estrategias que permiten mantener el turgor, bien mediante la regulación de la pérdida de agua por cierre estomático o mediante la acumulación de solutos para reducir su ψ_s (Verslues and Juenger, 2011). Con el objetivo de comprobar si la mutación altera la pérdida de agua a través de una mayor transpiración, se siguió la evolución de la conductancia estomática (G_s) y transpiración (E) durante un ciclo de deshidratación (**figura 59**), comprobando que la mutación del gen *SIWAK1* no altera la pérdida de agua transpiracional y, por tanto, la menor tolerancia del mutante está asociada con la menor capacidad para reducir el potencial osmótico en condiciones de estrés. El hecho de que la pérdida de agua por transpiración en condiciones de estrés no esté alterada en el mutante *wak1* era esperable teniendo en cuenta que el gen *SIWAK1* se expresa en raíz, aunque la raíz puede transmitir señales a la parte aérea que modifiquen la respuesta de esta, como ocurre en el caso del ABA (Christmann et al., 2013).

En resumen, los cambios inducidos en la respuesta fisiológica del mutante *wak1* por la salinidad y sequía demuestran que la menor tolerancia del mutante está asociada a la componente osmótica y ponen de manifiesto la importancia de considerar la componente osmótica, no solo en estrés hídrico sino también en

estrés salino, para el diseño de estrategias de mejora de la tolerancia a estreses abióticos en tomate, tal como era recientemente demostrado en plantas de tomate que sobreexpresaban la *dehidrina TAS14* (Muñoz-Mayor et al., 2012).

11.5. El gen *S/WAK1* está implicado en el metabolismo de la sacarosa en raíz

Aunque la ausencia de un fenotipo claro de sensibilidad del mutante *wak1* a los estreses hídrico y salino a medio plazo puede ser debido a la redundancia funcional entre los varios miembros de la familia *WAK* presentes en tomate, sin embargo, los resultados de los análisis de expresión de los genes adyacentes mostraban que las mayores diferencias con el WT solo se observaban antes de aplicar el estrés. Por tanto, el fenotipo sutil puede ser debido, más que a la redundancia de la familia génica, al hecho de que la expresión de estos genes también se reduce significativamente con el estrés en las plantas WT y, por consiguiente, las diferencias entre las tasas de desarrollo de WT y mutante son generalmente pequeñas a corto-medio plazo. Si bien, el mutante reduce significativamente el rendimiento en fruto respecto al WT, el principal órgano sumidero durante la etapa reproductiva, lo que sugiere que el mutante puede tener alterado el transporte de nutrientes y asimilados al fruto. En este sentido, es interesante señalar que el principal cambio metabólico en el mutante nulo de *Arabidopsis* fue la alteración en el metabolismo de la sacarosa en raíz (Kohorn et al., 2006b), y es precisamente la raíz junto con las hojas jóvenes los principales sumideros antes de la etapa de fructificación (Bolarin et al., 2001).

Nuestros resultados confirman que la anulación de *S/WAK1* altera el metabolismo de la sacarosa en la raíz, ya que se produce una acumulación significativa de sacarosa en la raíz del mutante en condiciones salinas y la consecuente reducción significativa asociada a las hojas jóvenes (**figura 61**). Teniendo en cuenta que la sacarosa es el principal fotoasimilado que se transporta desde los órganos fuentes (hojas fotosintéticamente activas) a los sumideros, una alteración en el metabolismo de sacarosa en la raíz puede afectar a todo el desarrollo de los otros órganos sumideros de la planta (hojas jóvenes y fruto). Así,

Balibrea et al (2000), observaron que el genotipo de tomate tolerante a salinidad acumulaba más azúcares en hojas y menos en raíz que el genotipo sensible a salinidad, es decir la tolerancia a salinidad parece estar relacionada con la redistribución de carbono entre raíz y parte aérea en tomate.

Entre las proteínas RLKs unidas a paredes celulares, las proteínas WAKs junto con otras proteínas como las PERKs, han sido recientemente propuestas como receptores/moduladores que pueden estar involucrados en la percepción de la presión de turgor (Christmann et al., 2013, Osakabe et al., 2014), tal como se señala en el esquema propuesto por Ringli (2010) (**figura 63**). Así, el tipo y la concentración de pectinas presente en la pared celular conducen a una activación de diferentes vías de señalización, ambas dependientes de proteínas tipo WAK, distinguiéndose la vía de respuesta basada en la expansión de pectinas que promueve la activación de MAPK-3 (Kohorn et al., 2009) y la invertasa vacuolar que regula el metabolismo de la sacarosa y, finalmente, el turgor en condiciones de estrés (Wang et al., 2001, Kohorn et al., 2006a).

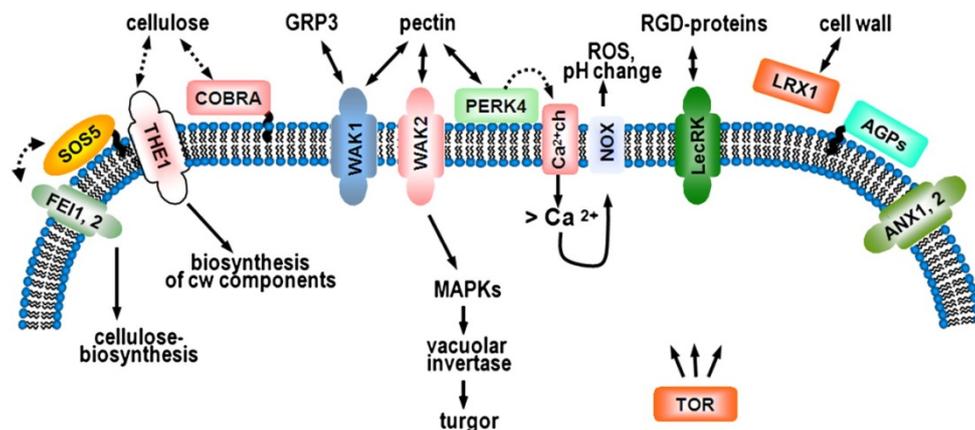


Figura 63. Funciones de las proteínas implicadas en la señalización y el desarrollo relacionados con la pared celular. (Ringli, 2010)

La sacarosa puede ser hidrolizada por diferentes invertasas dependiendo del mecanismo de la vía de descarga del floema en órganos sumidero (Koch, 2004, Roitsch and González, 2004). Se ha descrito ampliamente que este paso de hidrólisis es necesaria para el desarrollo de muchos tejidos sumidero y sus respuestas a varios tipos de estrés (Sturm, 1999, Weschke et al., 2003, Roitsch and

González, 2004, Huang et al., 2007, Essmann et al., 2008, Ruan et al., 2010). Entre las diferentes isoenzimas, se considera que la invertasa vacuolar (VIN) juega un papel importante frente al estrés, ya que la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa en la vacuola duplica el potencial osmótico de la sacarosa y permitirá poder absorber agua en condiciones de estrés y, por consiguiente, mantener el turgor (Sergeeva et al., 2006). Sin embargo, el papel osmótico de la VIN sólo parece actuar en los sumideros que acumulan altos niveles de hexosas, tales como los frutos de tomate y vid (Braun et al., 2014), mientras que en raíz su papel puede ser más bien de señalización (Wang et al., 2010, Wang and Ruan, 2013). Además, las hexosas generadas (glucosa y fructosa) de la hidrólisis de la sacarosas no solo son sustrato para crecimiento sino que también han sido reconocidas como reguladores de la expresión de genes (Roitsch and González, 2004).

Después de comprobar que la anulación de *SIWAK1* en tomate inducía una alteración en la redistribución de sacarosa en la planta en condiciones salinas, con una alta acumulación en raíz y disminución en hoja del mutante, tratamos de dilucidar si el mutante tenía alterado el patrón de expresión de los principales genes involucrados en el metabolismo de la sacarosa en raíz, y en primer lugar el gen que codifica para la invertasa vacuolar de tomate (*SIIVI*), ya que es el que se había propuesto en el modelo de *Arabidopsis* (Kohorn et al. 2006a). Además, en este estudio también se analizaron los niveles de expresión de una invertasa acida de pared expresada en raíz (*LIN6*), debido a que estas invertasas de pared parecen jugar un papel importante en situaciones de estrés, regulando su actividad para disminuir la concentración de sacarosa a nivel local en el tejido sumidero y, por lo tanto, aumentar la fuerza sumidero, proporcionando un mecanismo de mantenimiento y amplificación de los diversos estímulos y mejorando el flujo de asimilados (Roitsch and González, 2004). Finalmente, se analizó la expresión del inhibidor de invertasa (*SIINH*) por su posible interacción con otras invertasas (Zhang et al., 2013). Los niveles de expresión de estos tres genes son similares en el WT y mutante a los 0 y 2 días de tratamiento salino (200 mM NaCl), mientras que a los 5 días de tratamiento, que es exactamente cuándo se observa el aumento de sacarosa en raíz, se observa un incremento de los niveles de transcritos de *SIIVI*

de forma coordinada con la reducción de los niveles de transcritos de *S1NH* en el mutante, respecto a WT (**figura 62**). Estos resultados sugieren que la alteración en los niveles de expresión de ambos genes se produce como consecuencia de la acumulación de sacarosa en la raíz del mutante. Aunque el suministro de asimilados a la raíz, es decir, la manipulación de los transportadores de sacarosa y/o invertasas se ha propuesto como estrategia para aumentar la tolerancia a la sal por ayudar a mantener la homeostasis iónica y osmótica (Ghanem et al., 2011, Albacete et al., 2014), es necesario sin embargo, tener en cuenta que el mayor transporte de asimilados a la raíz puede ir en detrimento de otros órganos sumidero, especialmente el fruto, tal como parece ocurrir en el mutante *wak1*.

En situaciones de estrés, no solo la sacarosa sino también otros metabolitos como inositol, pueden tener un papel más importante que su contribución al ajuste osmótico, como puede ser su papel en la estabilización de membranas y proteínas y como resultado al mantenimiento del turgor (Peshev et al., 2013). El inositol se ha relacionado como un factor de tolerancia a distintos estreses abióticos (Lou et al., 2007). Así, la sobreexpresión de genes que inducen una mayor concentración de inositol induce tolerancia al estrés salino (Das-Chatterjee et al., 2006, Patra et al., 2010). En el mutante *wak1* hay un cambio realmente significativo en inositol, ya que se reduce su concentración en hoja joven prácticamente un 50% respecto al WT, mientras que no hay cambios en los otros órganos analizados (**figura 61**). Esta reducción está relacionada con la disminución de sacarosa en hoja joven ya que el inositol es formado a partir de la glucosa-6 fosfato proveniente de la sacarosa producida en la fotosíntesis. Si bien, el transporte de inositol en el floema también puede actuar como una señal hacia las raíces para mantener la biosíntesis de membranas y facilitar el transporte de Na^+ a larga distancia (Nelson et al., 1998). En este sentido, se ha sugerido un transporte de Na^+ dependiente de inositol en las raíces de las especies tolerantes a sal (Nelson et al., 1999). En el mutante *wak1* el menor transporte de Na^+ hacia las hojas podría estar relacionado con la menor acumulación de inositol en el mutante, aunque posteriores experimentos serían necesarios para confirmarlo. Por otra parte, se ha demostrado recientemente el

importante papel de los inositol-fosfato en la tolerancia al estrés en plantas (Sheard et al., 2010, Valluru and Van den Ende, 2011).

En resumen, estos son los primeros resultados sobre el papel del gen *SIWAK1* en la respuesta del tomate a los estreses salino e hídrico, donde se ha demostrado que este gen está implicado en la homeostasis osmótica. Además, la anulación del gen *SIWAK1* también altera el metabolismo de la sacarosa en raíz, afectando a la expresión de algunos de los genes implicados en el metabolismo de sacarosa en condiciones de salinidad, y afecta a la acumulación de inositol en hoja, lo que demuestra los diferentes procesos fisiológicos y metabólicos afectados por la anulación de este gen en tomate. Futuros estudios con líneas transgénicas donde se anulen los genes *SIWAKs* de forma individual y conjunta, así como con líneas de sobreexpresión del gen permitirán avances importantes en el conocimiento sobre el papel de estos genes en la tolerancia del tomate a estreses abióticos.

Conclusiones

VI. Conclusiones

CAPITULO 1. Identificación y caracterización del mutante *afs1* (*abnormal fruit set 1*) alterado en el desarrollo

1. La mutación responsable del fenotipo es monogénica y recesiva pero no está etiquetada por una inserción de T-DNA.
2. El mutante *afs1* posee mayor tasa de crecimiento, mayor tasa de floración y mayor tasa de cuajado, y produce frutos partenocárpico.
3. El cuajado de frutos ocurre de forma precoz y reconocible como un fenotipo de flor anómalo. No se observan malformaciones estructurales asociadas al gineceo y androceo en el fruto partenocárpico en el mutante pero el polen es escaso y poco viable.
4. El mutante incrementa significativamente el rendimiento en peso total de frutos debido al mayor número de frutos aunque el tamaño de los mismos sea menor que en el cultivar no transformado.
5. Los frutos *afs1* tienen un menor contenido en agua y los azúcares y ácidos orgánicos se concentran, por lo que su índice de sabor y maduración es superior. Sin embargo, tienen una pobre capacidad de conservación postcosecha.
6. Estos rasgos de partenocarpia, rendimiento y calidad de fruto convierten al mutante *afs1* en una línea interesante tanto para avanzar en el conocimiento de los procesos implicados en el desarrollo reproductivo y en la partenocarpia, como desde un punto de vista comercial.

CAPITULO 2. Identificación y caracterización del mutante *wak1* (*wall-associated kinase 1*) en condiciones de salinidad y sequía

1. El mutante *wak1* contiene un inserto de T-DNA en la región promotora del gen *SIWAK1* anulando su expresión pero no la de los genes flanqueantes *SIWAK2* y *SIWAK3*. En el cultivar Moneymaker el gen *SIWAK1* es específico de raíz y reduce su expresión con la salinidad.

VI. Conclusiones

2. La sensibilidad del mutante *wak1* a estrés abiótico solo se manifiesta después de un largo periodo de exposición al estrés. El mutante muestra un fenotipo sutil cuando se evalúa la tolerancia al estrés salino e hídrico a medio plazo, mientras que reduce el rendimiento en fruto cuando la salinidad se aplica a largo plazo.
3. El mutante es tolerante al estrés iónico inducido por la salinidad, con menor acumulación de Na^+ y menor relación Na^+/K^+ en sus hojas, respecto al cultivar no transformado, así como mayor contenido en clorofila durante la exposición a la sal.
4. Por el contrario, el mutante *wak1* muestra sensibilidad al estrés osmótico inducido por salinidad y sequía. La sensibilidad al efecto osmótico de *wak1* se caracteriza por una menor capacidad para reducir el potencial osmótico y mantener el contenido de agua en hoja ante el estrés osmótico.
5. El mutante tiene alterado el metabolismo de azúcares en raíz, que se refleja principalmente en una mayor acumulación de sacarosa en este órgano de la planta.
6. El análisis del mutante *wak1* ha permitido demostrar la importancia que puede tener el efecto osmótico en la tolerancia del tomate a la salinidad a largo plazo, ya que a pesar de la tolerancia al estrés iónico, el mutante *wak1* llega a reducir el rendimiento en fruto en condiciones de estrés salino.

Bibliografía

Bibliografía

- Abad, M. and Monteiro, A. A.** (1989) 'The use of auxins for the production of greenhouse tomatoes in mild-winter conditions: a review', *Scientia horticultrae*, 38(3), pp. 167-192.
- Adam, A., Galal, A., Manning, K. and Barna, B.** (2000) 'Inhibition of the development of leaf rust (*Puccinia recondita*) by treatment of wheat with allopurinol and production of a hypersensitive-like reaction in a compatible host', *Plant Pathology*, 49(3), pp. 317-323.
- Adamowski, M. and Friml, J.** (2015) 'PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution', *The Plant Cell Online*, pp. tpc. 114.134874.
- Adams-Phillips, L., Barry, C. and Giovannoni, J.** (2004) 'Signal transduction systems regulating fruit ripening', *Trends in plant science*, 9(7), pp. 331-338.
- Aflitos S, S. E., de Jong H, de Ridder D, Smit S, Finkers R, Wang J, Zhang G, Li N, Mao L, Bakker F, Dirks R, Breit T, Gravendeel B, Huits H, Struss D, Swanson-Wagner R, van Leeuwen H, van Ham RCHJ, Fito L, Guignier L, Sevilla M, Ellul P, Ganko E, Kapur A, Reclus E, de Geus B, van de Geest H, te Lintel HB, van Haarst J, Smits L, Koops A, Sanchez-Perez G, van Heusden AW, Visser R, Quan Z, Min J, Liao L, Wang X, Wang G, Yue Z, Yang X, Xu N, Schranz E, Smets E, Vos R, Rauwerda J, Ursem R, Schuit C, Kerns M, van den Berg J, Vriezen W, Janssen A, Datema E, Jahrman T, Moquet F, Bonnet J, Peters S** (2014) 'Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum* section *Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing', *Plant journal*, 80, pp. 134-148.
- Afzal, A. J., Wood, A. J. and Lightfoot, D. A.** (2008) 'Plant receptor-like serine threonine kinases: Roles in signaling and plant defense', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(5), pp. 507-517.
- AGI, A. G. I.** (2000) 'Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*', *nature*, 408(6814), pp. 796.
- Aguirre, R. and May, J. M.** (2008) 'Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C', *Pharmacology & therapeutics*, 119(1), pp. 96-103.
- Ahuja, I., de Vos, R. C., Bones, A. M. and Hall, R. D.** (2010) 'Plant molecular stress responses face climate change', *Trends in plant science*, 15(12), pp. 664-674.
- Alabadi, D., Aguero, M. S., Perez-Amador, M. A. and Carbonell, J.** (1996) 'Arginase, Arginine Decarboxylase, Ornithine Decarboxylase, and Polyamines in Tomato Ovaries (Changes in Unpollinated Ovaries and Parthenocarpic

- Fruits Induced by Auxin or Gibberellin)', *Plant Physiology*, 112(3), pp. 1237-1244.
- Albacete, A. A., Martínez-Andújar, C. and Pérez-Alfocea, F.** (2014) 'Hormonal and metabolic regulation of source–sink relations under salinity and drought: From plant survival to crop yield stability', *Biotechnology Advances*, 32(1), pp. 12-30.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. and Ullrich, C. I.** (2006) 'Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism', *Annals of Botany*, 97(5), pp. 883-893.
- Alvarado, M. C., Zsigmond, L. M., Kovács, I., Cséplö, A., Koncz, C. and Szabados, L. M.** (2004) 'Gene trapping with firefly luciferase in Arabidopsis. Tagging of stress-responsive genes', *Plant Physiology*, 134(1), pp. 18-27.
- Ampomah-Dwamena, C., Morris, B. A., Sutherland, P., Veit, B. and Yao, J.-L.** (2002) 'Down-Regulation of TM29, a Tomato SEPALLATA Homolog, Causes Parthenocarpic Fruit Development and Floral Reversion', *Plant Physiology*, 130(2), pp. 605-617.
- An, S., Park, S., Jeong, D.-H., Lee, D.-Y., Kang, H.-G., Yu, J.-H., Hur, J., Kim, S.-R., Kim, Y.-H. and Lee, M.** (2003) 'Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice', *Plant Physiology*, 133(4), pp. 2040-2047.
- Asahira T, T. H., Takeda Y, Tsukamoto Y** (1968) 'Cytokinin activity in extracts from pollinated, auxin- and gibberellin-induced parthenocarpic tomato fruits and its effect on the histology of the fruit', *Studies on fruit development on tomato.*, 29 pp. 24–54
- Asamizu, E. and Ezura, H.** (2009) 'Inclusion of Tomato in the Genus *Solanum* as "*Solanum lycopersicum*" is Evident from Phylogenetic Studies', *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 78(1), pp. 3-5.
- Asano, T., Hakata, M., Nakamura, H., Aoki, N., Komatsu, S., Ichikawa, H., Hirochika, H. and Ohsugi, R.** (2011) 'Functional characterisation of *OsCPK21*, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice', *Plant Molecular Biology*, 75(1-2), pp. 179-191.
- Asins, M., Raga, V., Roca, D., Belver, A. and Carbonell, E.** (2015) 'Genetic dissection of tomato rootstock effects on scion traits under moderate salinity', *Theoretical and Applied Genetics*, 128(4), pp. 667-679.

- Asins, M. J., Villalta, I., Aly, M. M., Olías, R., Álvarez De Morales, P. A. Z., Huertas, R., Li, J. U. N., Jaime-PÉRez, N., Haro, R., Raga, V., Carbonell, E. A. and Belver, A.** (2013) 'Two closely linked tomato *HKT* coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na⁺/K⁺ homeostasis', *Plant, Cell & Environment*, 36(6), pp. 1171-1191.
- Atarés, A., Moyano, E., Morales, B., Schleicher, P., García-Abellán, J. O., Antón, T., García-Sogo, B., Perez-Martin, F., Lozano, R., Flores, F. B., Moreno, V., del Carmen Bolarin, M. and Pineda, B.** (2011) 'An insertional mutagenesis programme with an enhancer trap for the identification and tagging of genes involved in abiotic stress tolerance in the tomato wild-related species *Solanum pennellii*', *Plant Cell Reports*, 30(10), pp. 1865-1879.
- Atwell, S., Huang, Y. S., Vilhjalmsón, B. J., Willems, G., Horton, M., Li, Y., Meng, D., Platt, A., Tarone, A. M., Hu, T. T., Jiang, R., Mulyati, N. W., Zhang, X., Amer, M. A., Baxter, I., Brachi, B., Chory, J., Dean, C., Debieu, M., de Meaux, J., Ecker, J. R., Faure, N., Kniskern, J. M., Jones, J. D. G., Michael, T., Nemri, A., Roux, F., Salt, D. E., Tang, C., Todesco, M., Traw, M. B., Weigel, D., Marjoram, P., Borevitz, J. O., Bergelson, J. and Nordborg, M.** (2010) 'Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines', *Nature*, 465(7298), pp. 627-631.
- Azpiroz-Leehan, R. and Feldmann, K. A.** (1997) 'T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth', *Trends in Genetics*, 13(4), pp. 152-156.
- Azzi, L., Deluche, C., Gévaudant, F., Frangne, N., Delmas, F., Hernould, M. and Chevalier, C.** (2015) 'Fruit growth-related genes in tomato', *Journal of Experimental Botany*.
- Bagnaresi, P., Biselli, C., Orru, L., Urso, S., Crispino, L., Abbruscato, P., Piffanelli, P., Lupotto, E., Cattivelli, L. and Vale, G.** (2012) 'Comparative transcriptome profiling of the early response to *Magnaporthe oryzae* in durable resistant vs susceptible rice (*Oryza sativa* L.) genotypes', *PLoS One*, 7(12), pp. e51609.
- Bairu, M., Aremu, A. and Van Staden, J.** (2011) 'Somaclonal variation in plants: causes and detection methods', *Plant Growth Regulation*, 63(2), pp. 147-173.
- Bajji, M., Kinet, J.-M. and Lutts, S.** (2002) 'Osmotic and ionic effects of NaCl on germination, early seedling growth, and ion content of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae)', *Canadian Journal of Botany*, 80(3), pp. 297-304.
- Balibrea, M. E., Dell'Amico, J., Bolarín, M. C. and Pérez-Alfocea, F.** (2000) 'Carbon partitioning and sucrose metabolism in tomato plants growing under salinity', *Physiologia Plantarum*, 110(4), pp. 503-511.

- Bandurska, H. and Gniazdowska-Skoczek, H.** (1995) 'Cell membrane stability in two barley genotypes under water stress conditions', *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 64(1), pp. 29-32.
- Barragán, V., Leidi, E. O., Andrés, Z., Rubio, L., de Luca, A., Fernández, J. A., Cubero, B. and Pardo, J. M.** (2012) 'Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in arabidopsis', *Plant Cell*, 24(3), pp. 1127-1142.
- Barthels, N., van der Lee, F. M., Klap, J., Goddijn, O., Karimi, M., Puzio, P., Grundler, F., Ohl, S. A., Lindsey, K. and Robertson, L.** (1997) 'Regulatory sequences of Arabidopsis drive reporter gene expression in nematode feeding structures', *The Plant Cell Online*, 9(12), pp. 2119-2134.
- Bassil, E., Ohto, M. A., Esumi, T., Tajima, H., Zhu, Z., Cagnac, O., Belmonte, M., Peleg, Z., Yamaguchi, T. and Blumwald, E.** (2011) 'The Arabidopsis intracellular Na⁺/H⁺ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development', *Plant Cell*, 23(1), pp. 224-239.
- Bates, G. W., Rosenthal, D. M., Sun, J., Chattopadhyay, M., Pepper, E., Yang, J., Ort, D. R. and Jones, A. M.** (2012) 'A Comparative Study of the *Arabidopsis thaliana* Guard-Cell Transcriptome and Its Modulation by Sucrose', *PLoS ONE*, 7(11), pp. e49641.
- Bauchet, G. and Causse, M.** (2012) 'Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives', *Genetic Diversity in Plants*, pp. 133-162.
- Belver, A., Olías, R., Huertas, R. and Rodríguez-Rosales, M. P.** (2012) 'Involvement of *S/SOS2* in tomato salt tolerance', *Bioengineered*, 3(5), pp. 298-302.
- Benlloch-González, M., García, J., García-Mateo, M.-J., Benlloch, M. and Fournier, J.-M.** (2012) 'K⁺ starvation causes a differential effect on shoot and root K⁺(Rb⁺) uptake in sunflower plants', *Scientia Horticulturae*, 146, pp. 153-158.
- Beraldi, D., Picarella, M., Soressi, G. and Mazzucato, A.** (2004) 'Fine mapping of the parthenocarpic fruit (*pat*) mutation in tomato', *Theoretical and Applied Genetics*, 108(2), pp. 209-216.
- Bergougnoux, V.** (2014) 'The history of tomato: From domestication to biopharming', *Biotechnology Advances*, 32(1), pp. 170-189.
- Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublát, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essah, P. A., Tester, M., Véry, A. A., Sentenac, H. and Casse, F.** (2003)

- 'Functional analysis of *AtHKT1* in Arabidopsis shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance', *EMBO Journal*, 22(9), pp. 2004-2014.
- Beyer, E. M. Q., B.** (1974) 'Parthenocarpy in cucumber: mechanism of action of auxin transport inhibitors', *J Am Soc Hort Sci* 99, pp. 5.
- Bisogni, C., Armbruster, G. and Brecht, P.** (1976) 'Quality comparisons of room ripened and field ripened tomato fruits', *Journal of Food Science*, 41(2), pp. 333-338.
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J. and Nuez, F.** (2012) 'Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato', *PLoS one*, 7(10), pp. e48198.
- Bolarin, M. C., Estañ, M. T., Caro, M., Romero-Aranda, R. and Cuartero, J.** (2001) 'Relationship between tomato fruit growth and fruit osmotic potential under salinity', *Plant Science*, 160(6), pp. 1153-1159.
- Bosch, M. and Hepler, P. K.** (2005) 'Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes', *The Plant Cell Online*, 17(12), pp. 3219-3226.
- Bramley, P. M.** (2000) 'Is lycopene beneficial to human health?', *Phytochemistry*, 54(3), pp. 233-236.
- Braun, D. M., Wang, L. and Ruan, Y.-L.** (2014) 'Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security', *Journal of experimental botany*, 65(7), pp. 1713-1735.
- Brody, J. R. and Kern, S. E.** (2004) 'Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis', *Biotechniques*, 36(2), pp. 214-217.
- Brummell, D. A.** (2006) 'Cell wall disassembly in ripening fruit', *Functional Plant Biology*, 33(2), pp. 103-119.
- Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F. and De Lorenzo, G.** (2010) 'A domain swap approach reveals a role of the plant *wall-associated kinase 1* (*WAK1*) as a receptor of oligogalacturonides', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), pp. 9452-9457.
- Bunger-Kibler S, B. F.** (1983) ' Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators', *Plant Growth Regulation*, 1, pp. 143–154.
- Burbidge, A., Grieve, T. M., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D. R. and Taylor, I. B.** (1999) 'Characterization of the ABA-deficient tomato

- mutant notabilisand its relationship with maizeVp14', *The Plant Journal*, 17(4), pp. 427-431.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. and Wittwer, C. T.** (2009) 'The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments', *Clinical Chemistry*, 55(4), pp. 611-622.
- Campisi, L., Yang, Y., Yi, Y., Heilig, E., Herman, B., Cassista, A. J., Allen, D. W., Xiang, H. and Jack, T.** (1999) 'Generation of enhancer trap lines in Arabidopsis and characterization of expression patterns in the inflorescence', *The Plant Journal*, 17(6), pp. 699-707.
- Canene-Adams, K., Campbell, J. K., Zaripheh, S., Jeffery, E. H. and Erdman, J. W.** (2005) 'The tomato as a functional food', *The Journal of nutrition*, 135(5), pp. 1226-1230.
- Carmi, N., Salts, Y., Dedicova, B., Shabtai, S. and Barg, R.** (2003) 'Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary', *Planta*, 217(5), pp. 726-735.
- Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Peres, L. E. P., Atares, A. and Garcia-Martinez, J. L.** (2012) 'Characterization of the procerca Tomato Mutant Shows Novel Functions of the SIDELLA Protein in the Control of Flower Morphology, Cell Division and Expansion, and the Auxin-Signaling Pathway during Fruit-Set and Development', *Plant Physiology*, 160(3), pp. 1581-1596.
- Carvalho, R. F., Campos, M. L., Pino, L. E., Crestana, S. L., Zsögön, A., Lima, J. E., Benedito, V. A. and Peres, L. E.** (2011) 'Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research', *Plant Methods*, 7(1), pp. 1-14.
- Casson, S. A., Chilley, P. M., Topping, J. F., Evans, I. M., Souter, M. A. and Lindsey, K.** (2002) 'The POLARIS gene of Arabidopsis encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning', *The Plant Cell Online*, 14(8), pp. 1705-1721.
- Cause, M., Desplat, N., Pascual, L., Le Paslier, M.-C., Sauvage, C., Bauchet, G., Bérard, A., Bounon, R., Tchoumakov, M., Brunel, D. and Bouchet, J.-P.** (2013) 'Whole genome resequencing in tomato reveals variation associated with introgression and breeding events', *BMC genomics*, 14(1), pp. 791.
- Centeno, D. C., Osorio, S., Nunes-Nesi, A., Bertolo, A. L. F., Carneiro, R. T., Araújo, W. L., Steinhauser, M.-C., Michalska, J., Rohrmann, J.,**

- Geigenberger, P., Oliver, S. N., Stitt, M., Carrari, F., Rose, J. K. C. and Fernie, A. R.** (2011) 'Malate Plays a Crucial Role in Starch Metabolism, Ripening, and Soluble Solid Content of Tomato Fruit and Affects Postharvest Softening', *The Plant Cell*, 23(1), pp. 162-184.
- Clark, S. E., Williams, R. W. and Meyerowitz, E. M.** (1997) 'The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in arabidopsis', *Cell*, 89(4), pp. 575-585.
- Coca, M. and San Segundo, B.** (2010) 'AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in Arabidopsis', *Plant Journal*, 63(3), pp. 526-540.
- Coen, E. S. and Meyerowitz, E. M.** (1991) 'The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development', *Nature*, 353(6339), pp. 31-37.
- Colcombet, J. and Hirt, H.** (2008) 'Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes', *Biochem. J*, 413, pp. 217-226.
- Costa, S. and Shaw, P.** (2007) "Open minded'cells: how cells can change fate', *Trends in cell biology*, 17(3), pp. 101-106.
- Costantini, E., Landi, L., Silvestroni, O., Pandolfini, T., Spena, A. and Mezzetti, B.** (2007) 'Auxin synthesis-encoding transgene enhances grape fecundity', *Plant physiology*, 143(4), pp. 1689-1694.
- Cuartero, J., Bolarin, M. C., Moreno, V. and Pineda, B.** (2009) 'Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants', *Molecular Techniques in Crop Improvement*. Springer, pp. 373-405.
- Cucinotta, M., Colombo, L. and Roig-Villanova, I.** (2014) 'Ovule development, a new model for lateral organ formation', *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Chae, L., Sudat, S., Dudoit, S., Zhu, T. and Luan, S.** (2009) 'Diverse transcriptional programs associated with environmental stress and hormones in the arabidopsis receptor-like kinase gene family', *Molecular Plant*, 2(1), pp. 84-107.
- Chamarro, J.** (1995) 'Anatomía y fisiología de la planta. ', *En Nuez F (ed) El cultivo del Tomate. Ediciones Mundi Prensa. Madrid*, pp. 6.
- Chapman, M. A., Pashley, C. H., Wenzler, J., Hvala, J., Tang, S., Knapp, S. J. and Burke, J. M.** (2008) 'A Genomic Scan for Selection Reveals Candidates for Genes Involved in the Evolution of Cultivated Sunflower (*Helianthus annuus*)', *The Plant Cell Online*, 20(11), pp. 2931-2945.

- Chen, F. Q. and Foolad, M. R.** (1999) 'A molecular linkage map of tomato based on a cross between *Lycopersicon esculentum* and *L. pimpinellifolium* and its comparison with other molecular maps of tomato', *Genome*, 42(1), pp. 94-103.
- Chen, K.-Y., Cong, B., Wing, R., Vrebalov, J. and Tanksley, S. D.** (2007) 'Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes', *Science*, 318(5850), pp. 643-645.
- Chen, K.-Y. and Tanksley, S. D.** (2004) 'High-Resolution Mapping and Functional Analysis of se2.1: A Major Stigma Exsertion Quantitative Trait Locus Associated With the Evolution From Allogamy to Autogamy in the Genus *Lycopersicon*', *Genetics*, 168(3), pp. 1563-1573.
- Chen, T. H. H. and Murata, N.** (2011) 'Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: Mechanisms and biotechnological applications', *Plant, Cell and Environment*, 34(1), pp. 1-20.
- Cheng, Y. and Zhao, Y.** (2007) 'A role for auxin in flower development', *Journal of integrative plant biology*, 49(1), pp. 99-104.
- Christmann, A., Grill, E. and Huang, J.** (2013) 'Hydraulic signals in long-distance signaling', *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), pp. 293-300.
- Das-Chatterjee, A., Goswami, L., Maitra, S., Dastidar, K. G., Ray, S. and Majumder, A. L.** (2006) 'Introgression of a novel salt-tolerant L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka (PcINO1) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms', *FEBS Letters*, 580(16), pp. 3980-3988.
- Davenport, R. J., Muñoz-Mayor, A., Jha, D., Essah, P. A., Rus, A. and Tester, M.** (2007) 'The Na⁺ transporter AtHKT1;1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis', *Plant, Cell and Environment*, 30(4), pp. 497-507.
- De Greve, H., Nguyen, V. K., Deboeck, F., Thia-Toong, L., Karimi, M. and Hernalsteens, J.-P.** (2001) 'T-DNA tagging of the translation initiation factor eIF-4A1 of *Arabidopsis thaliana*', *Plant Science*, 161(4), pp. 685-693.
- De Jong, M., Mariani, C. and Vriezen, W. H.** (2009a) 'The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set', *Journal of Experimental Botany*, 60(5), pp. 1523-1532.
- De Jong, M., Wolters-Arts, M., Feron, R., Mariani, C. and Vriezen, W. H.** (2009b) 'The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (*SIARF7*) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development', *The Plant Journal*, 57(1), pp. 160-170.

- De Jong, M., Wolters-Arts, M., García-Martínez, J. L., Mariani, C. and Vriezen, W. H.** (2011) 'The *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (*SIARF7*) mediates cross-talk between auxin and gibberellin signalling during tomato fruit set and development', *Journal of Experimental Botany*, 62(2), pp. 617-626.
- De Oliveira, L. F. V., Christoff, A. P., de Lima, J. C., de Ross, B. C. F., Sachetto-Martins, G., Margis-Pinheiro, M. and Margis, R.** (2014) 'The Wall-associated Kinase gene family in rice genomes', *Plant Science*, 229(0), pp. 181-192.
- De Smet, I., Vassileva, V., De Rybel, B., Levesque, M. P., Grunewald, W., Van Damme, D., Van Noorden, G., Naudts, M., Van Isterdael, G., De Clercq, R., Wang, J. Y., Meuli, N., Vanneste, S., Friml, J., Hilson, P., Jürgens, G., Ingram, G. C., Inzé, D., Benfey, P. N. and Beeckman, T.** (2008) 'Receptor-like kinase *ACR4* restricts formative cell divisions in the Arabidopsis root', *Science*, 322(5901), pp. 594-597.
- DeCandolle** (1886) *Origin of cultivated plants*. New York: Hafner Publishing Company.
- Decreux, A. and Messiaen, J.** (2005) 'Wall-associated Kinase *WAK1* Interacts with Cell Wall Pectins in a Calcium-induced Conformation', *Plant and Cell Physiology*, 46(2), pp. 268-278.
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G. and Schroeder, J. I.** (2014) 'Plant salt-tolerance mechanisms', *Trends in plant science*, 19(6), pp. 371-379.
- Diévert, A. and Clark, S. E.** (2004) 'LRR-containing receptors regulating plant development and defense', *Development*, 131(2), pp. 251-261.
- Doganlar, S., Frary, A., Ku, H.-M. and Tanksley, S.** (2002) 'Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589)', *Genome*, 45(6), pp. 1189-1202.
- Dumas, C. and Mogensen, H. L.** (1993) 'Gametes and Fertilization: Maize as a Model System for Experimental Embryogenesis in Flowering Plants', *The Plant Cell*, 5(10), pp. 1337-1348.
- Elliott, K., Butler, W., Dickinson, C., Konno, Y., Vedvick, T., Fitzmaurice, L. and Mirkov, T. E.** (1993) 'Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening', *Plant Molecular Biology*, 21(3), pp. 515-524.
- Esau, K.** (1985) *Anatomía vegetal*. Omega.

- Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schön, H., Sonnewald, S., Weis, E. and Scharte, J.** (2008) 'RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco', *Plant Physiology*, 147(3), pp. 1288-1299.
- Estañ, M. T., Martínez-Rodríguez, M. M., Pérez-Alfocea, F., Flowers, T. J. and Bolarin, M. C.** (2005) 'Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot', *Journal of experimental botany*, 56(412), pp. 703-712.
- FAO** (2012) *Food and Agricultural Organization*. Disponible en:
<http://faostat3.fao.org>
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S. M. A.** (2009) 'Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management', in Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Véronique, S. & Alberola, C. (eds.) *Sustainable Agriculture*. Springer Netherlands, pp. 153-188.
- Farrar, K., Evans, I. M., Topping, J. F., Souter, M. A., Nielsen, J. E. and Lindsey, K.** (2003) '*EXORDIUM-a* gene expressed in proliferating cells and with a role in meristem function, identified by promoter trapping in Arabidopsis', *The Plant Journal*, 33(1), pp. 61-73.
- Faurobert, M., Mihr, C., Bertin, N., Pawlowski, T., Negroni, L., Sommerer, N. and Cause, M.** (2007) 'Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening', *Plant Physiology*, 143(3), pp. 1327-1346.
- Fedoroff, N. V. and Smith, D. L.** (1993) 'A versatile system for detecting transposition in Arabidopsis', *The Plant Journal*, 3(2), pp. 273-289.
- Fei, Z., Tang, X., Alba, R. M., White, J. A., Ronning, C. M., Martin, G. B., Tanksley, S. D. and Giovannoni, J. J.** (2004) 'Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening', *The Plant Journal*, 40(1), pp. 47-59.
- Feraru, E. and Friml, J.** (2008) 'PIN Polar Targeting', *Plant Physiology*, 147(4), pp. 1553-1559.
- Fernandez-Panchon, M., Villano, D., Troncoso, A. and Garcia-Parrilla, M.** (2008) 'Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence', *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(7), pp. 649-671.
- Ficcadenti, N., Sestili, S., Pandolfini, T., Cirillo, C., Rotino, G. L. and Spena, A.** (1999) 'Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato', *Molecular Breeding*, 5(5), pp. 463-470.

- Fobert, P. R., Labbé, H., Cosmopoulos, J., Gottlob-McHugh, S., Ouellet, T., Hattori, J., Sunohara, G., Iyer, V. and Miki, B. L.** (1994) 'T-DNA tagging of a seed coat-specific cryptic promoter in tobacco', *The Plant Journal*, 6(4), pp. 567-577.
- Foolad, M. R.** (2007) 'Genome mapping and molecular breeding of tomato', *International Journal of Plant Genomics*, 2007.
- Fos, M., Nuez, F. and García-Martínez, J. L.** (2000) 'The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries', *Plant Physiology*, 122(2), pp. 471-480.
- Fos, M., Proaño, K., Alabadí, D., Nuez, F., Carbonell, J. and García-Martínez, J. L.** (2003) 'Polyamine metabolism is altered in unpollinated parthenocarpic *pat-2* tomato ovaries', *Plant physiology*, 131(1), pp. 359-366.
- Fos, M., Proaño, K., Nuez, F. and García-Martínez, J. L.** (2001) 'Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato', *Physiologia plantarum*, 111(4), pp. 545-550.
- Fulton, L., Vaddepalli, P., Yadav, R. K., Batoux, M. and Schneitz, K.** (2010) 'Inter-cell-layer signalling during Arabidopsis ovule development mediated by the receptor-like kinase STRUBBELIG', *Biochemical Society Transactions*, 38(2), pp. 583-587.
- Gapper, N. E., McQuinn, R. P. and Giovannoni, J. J.** (2013) 'Molecular and genetic regulation of fruit ripening', *Plant molecular biology*, 82(6), pp. 575-591.
- García-Abellan, J. O., Fernandez-Garcia, N., Lopez-Berenguer, C., Egea, I., Flores, F. B., Angosto, T., Capel, J., Lozano, R., Pineda, B., Moreno, V., Olmos, E. and Bolarin, M. C.** (2015) 'The tomato *res* mutant which accumulates JA in roots in non-stressed conditions restores cell structure alterations under salinity', *Physiologia Plantarum*, pp. n/a-n/a.
- García-Hurtado, N., Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., López-Gresa, M. P., Hedden, P., Gong, F. and García-Martínez, J. L.** (2012) 'The characterization of transgenic tomato overexpressing gibberellin 20-oxidase reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration of the gibberellin biosynthetic pathway', *Journal of Experimental Botany*.
- García-Martínez, J. L., Santes, C., Croker, S. J. and Hedden, P.** (1991) 'Identification, quantitation and distribution of gibberellins in fruits of *Pisum sativum* L. cv. Alaska during pod development', *Planta*, 184(1), pp. 53-60.
- García-Abellan, J. O., Egea, I., Pineda, B., Sanchez-Bel, P., Belver, A., Garcia-Sogo, B., Flores, F. B., Atares, A., Moreno, V. and Bolarin, M. C.** (2014)

- 'Heterologous expression of the yeast *HAL5* gene in tomato enhances salt tolerance by reducing shoot Na⁺ accumulation in the long term', *Physiologia plantarum*, 152(4), pp. 700-713.
- Garcia, M., Asins, M. and Carbonell, E.** (2000) 'QTL analysis of yield and seed number in Citrus', *Theoretical and Applied Genetics*, 101(3), pp. 487-493.
- Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Michaux-Ferrière, N., Thibaud, J. B. and Sentenac, H.** (1998) 'Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap', *Cell*, 94(5), pp. 647-655.
- George, W., Scott, J. and Splittstoesser, W.** (1984) 'Parthenocarpy in tomato', *Horticultural Reviews, Volume 6*, pp. 65-84.
- Germain, H., Gray-Mitsumune, M., Lafleur, E. and Matton, D. P.** (2008) 'ScORK17, a transmembrane receptor-like kinase predominantly expressed in ovules is involved in seed development', *Planta*, 228(5), pp. 851-862.
- Ghanem, M. E., Albacete, A., Smigocki, A. C., Frébort, I., Pospíšilová, H., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Sánchez-Bravo, J., Lutts, S., Dodd, I. C. and Pérez-Alfocea, F.** (2011) 'Root-synthesized cytokinins improve shoot growth and fruit yield in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants', *Journal of Experimental Botany*, 62(1), pp. 125-140.
- Gidoni, D., Fuss, E., Burbidge, A., Speckmann, G., James, S., Nijkamp, D., Mett, A., Feiler, J., Smoker, M. and de Vroomen, M.** (2003) 'Multi-functional T-DNA/Ds tomato lines designed for gene cloning and molecular and physical dissection of the tomato genome', *Plant molecular biology*, 51(1), pp. 83-98.
- Gillaspy, G., Ben-David, H. and Gruissem, W.** (1993) 'Fruits: a developmental perspective', *The Plant Cell*, 5(10), pp. 1439.
- Giovannoni, J. J.** (2004) 'Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening', *The Plant Cell*, 16(suppl 1), pp. S170-S180.
- Giovannoni, J. J.** (2007) 'Fruit ripening mutants yield insights into ripening control', *Current opinion in plant biology*, 10(3), pp. 283-289.
- Gisbert, C., Rus, A. M., Bolarín, M. C., López-Coronado, J. M., Arrillaga, I., Montesinos, C., Caro, M., Serrano, R. and Moreno, V.** (2000) 'The yeast *HAL1* gene improves salt tolerance of transgenic tomato', *Plant Physiology*, 123(1), pp. 393-402.
- Gobert, A., Park, G., Amtmann, A., Sanders, D. and Maathuis, F. J.** (2006) '*Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective

- ion transporter involved in germination and cation transport', *Journal of Experimental Botany*, 57(4), pp. 791-800.
- Goetz, M., Hooper, L. C., Johnson, S. D., Rodrigues, J. C. M., Vivian-Smith, A. and Koltunow, A. M.** (2007) 'Expression of aberrant forms of *AUXIN RESPONSE FACTOR8* stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato', *Plant Physiology*, 145(2), pp. 351-366.
- Goldsbrough, A. P., Tong, Y. and Yoder, J. I.** (1996) 'Lc as a non-destructive visual reporter and transposition excision marker gene for tomato', *The Plant Journal*, 9(6), pp. 927-933.
- Gómez, M., Beltrán, J.-P. and Cañas, L.** (2004) 'The pea END1 promoter drives anther-specific gene expression in different plant species', *Planta*, 219(6), pp. 967-981.
- Gómez, M. D., Vera-Sirera, F. and Pérez-Amador, M. A.** (2014) 'Molecular programme of senescence in dry and fleshy fruits', *Journal of experimental botany*, pp. eru093.
- Gorguet, B., Eggink, P. M., Ocana, J., Tiwari, A., Schipper, D., Finkers, R., Visser, R. G. and van Heusden, A. W.** (2008) 'Mapping and characterization of novel parthenocarpy QTLs in tomato', *Theoretical and Applied Genetics*, 116(6), pp. 755-767.
- Gorguet, B., van Heusden, A. W. and Lindhout, P.** (2005) 'Parthenocarpic Fruit Development in Tomato', *Plant Biology*, 7(2), pp. 131-139.
- Grandillo, S. and Tanksley, S. D.** (1996) 'Genetic analysis of RFLPs, GATA microsatellites and RAPDs in a cross between *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*', *Theoretical and applied genetics*, 92(8), pp. 957-965.
- Grennan, A. K. and Gragg, J.** (2009) 'How Sweet It Is: Identification of Vacuolar Sucrose Transporters', *Plant Physiology*, 150(3), pp. 1109-1110.
- Groover, A., Fontana, J. R., Dupper, G., Ma, C., Martienssen, R., Strauss, S. and Meilan, R.** (2004) 'Gene and enhancer trap tagging of vascular-expressed genes in poplar trees', *Plant physiology*, 134(4), pp. 1742-1751.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M. F. and Martienssen, R.** (1998) 'The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development', *Development*, 125(8), pp. 1509-1517.
- Guinn, E. J., Pegram, L. M., Capp, M. W., Pollock, M. N. and Record Jr, M. T.** (2011) 'Quantifying why urea is a protein denaturant, whereas glycine betaine is a protein stabilizer', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(41), pp. 16932-16937.

- Gulick, P., Ashrafi, H., Kinkade, M. and Foolad, M.** (2009) 'A new genetic linkage map of tomato based on a *Solanum lycopersicum* × *S.pimpinellifolium* RIL population displaying locations of candidate pathogen response genes', *Genome*, 52(11), pp. 935-956.
- Guo, K. M., Babourina, O., Christopher, D. A., Borsics, T. and Rengel, Z.** (2008) 'The cyclic nucleotide-gated channel, AtCNGC10, influences salt tolerance in Arabidopsis', *Physiologia Plantarum*, 134(3), pp. 499-507.
- Gustafson, F. G.** (1939) 'Auxin distribution in fruits and its significance in fruit development', *American Journal of Botany*, pp. 189-194.
- Hall, D., Evans, A. R., Newbury, H. J. and Pritchard, J.** (2006) 'Functional analysis of *CHX21*: A putative sodium transporter in Arabidopsis', *Journal of Experimental Botany*, 57(5), pp. 1201-1210.
- Hanson, J. and Smeekens, S.** (2009) 'Sugar perception and signaling—an update', *Current opinion in plant biology*, 12(5), pp. 562-567.
- Harker, F. R. and Sutherland, P. W.** (1993) 'Physiological changes associated with fruit ripening and the development of mealy texture during storage of nectarines', *Postharvest Biology and Technology*, 2(4), pp. 269-277.
- Harrison, E., Burbidge, A., Okyere, J., Thompson, A. J. and Taylor, I. B.** (2011) 'Identification of the tomato ABA-deficient mutant sitiens as a member of the ABA-aldehyde oxidase gene family using genetic and genomic analysis', *Plant Growth Regulation*, 64(3), pp. 301-309.
- Hartley, R. W.** (1988) 'Barnase and barstar: expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease', *Journal of molecular biology*, 202(4), pp. 913-915.
- Hasegawa, P. M.** (2013) 'Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants', *Environmental and Experimental Botany*, 92, pp. 19-31.
- Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C. and Hodge, S.** (1997) 'Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), pp. 2122-2127.
- He, P., Li, J., Zheng, X., Shen, L., Lu, C., Chen, Y. and Zhu, L.** (2001) 'Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross', *Crop Science*, 41(4), pp. 1240-1246.

- He, Z.-H., Cheeseman, I., He, D. and Kohorn, B.** (1999) 'A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, *Wak1-5*, are expressed in specific organs of Arabidopsis', *Plant Molecular Biology*, 39(6), pp. 1189-1196.
- He, Z.-H., He, D. and Kohorn, B. D.** (1998) 'Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response', *The Plant Journal*, 14(1), pp. 55-63.
- Hedden, P.** (1997) 'Gibberellin biosynthesis', *eLS*.
- Heuvelink, E.** (1995) 'Growth, development and yield of a tomato crop: periodic destructive measurements in a greenhouse', *Scientia Horticulturae*, 61(1-2), pp. 77-99.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I.** (1950) 'The water-culture method for growing plants without soil', *Circular. California Agricultural Experiment Station*, 347(2nd edit).
- Hoel, B. O. and Solhaut, K. A.** (1998) 'Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter', *Annals of Botany*, 82(3), pp. 389-392.
- Horie, T., Costa, A., Kim, T. H., Han, M. J., Horie, R., Leung, H. Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G. and Schroeder, J. I.** (2007) 'Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth', *EMBO Journal*, 26(12), pp. 3003-3014.
- Horie, T., Hauser, F. and Schroeder, J. I.** (2009) 'HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants', *Trends in Plant Science*, 14(12), pp. 660-668.
- Horie, T., Horie, R., Chan, W. Y., Leung, H. Y. and Schroeder, J. I.** (2006) 'Calcium regulation of sodium hypersensitivities of *sos3* and *athkt1* mutants', *Plant and Cell Physiology*, 47(5), pp. 622-633.
- Hou, X., Tong, H., Selby, J., DeWitt, J., Peng, X. and He, Z.-H.** (2005) 'Involvement of a Cell Wall-Associated Kinase, *WAKL4*, in Arabidopsis Mineral Responses', *Plant Physiology*, 139(4), pp. 1704-1716.
- Hua, B.-G., Mercier, R. W., Leng, Q. and Berkowitz, G. A.** (2003) 'Plants do it differently. A new basis for potassium/sodium selectivity in the pore of an ion channel', *Plant Physiology*, 132(3), pp. 1353-1361.
- Huang, L.-F., Bocock, P. N., Davis, J. M. and Koch, K. E.** (2007) 'Regulation of invertase: a 'suite' of transcriptional and post-transcriptional mechanisms', *Functional Plant Biology*, 34(6), pp. 499-507.

- Huang, S., Cerny, R. E., Qi, Y., Bhat, D., Aydt, C. M., Hanson, D. D., Malloy, K. P. and Ness, L. A.** (2003) 'Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development', *Plant Physiology*, 131(3), pp. 1270-1282.
- Huang, X., Feng, Q., Qian, Q., Zhao, Q., Wang, L., Wang, A., Guan, J., Fan, D., Weng, Q., Huang, T., Dong, G., Sang, T. and Han, B.** (2009) 'High-throughput genotyping by whole-genome resequencing', *Genome research*, 19(6), pp. 1068-1076.
- Huertas, R., Olias, R., Eljakaoui, Z., Gálvez, F. J., Li, J., De Morales, P. A., Belver, A. and Rodríguez-Rosales, M. P.** (2012) 'Overexpression of *SISOS2* (SICIPK24) confers salt tolerance to transgenic tomato', *Plant, cell & environment*, 35(8), pp. 1467-1482.
- Huttly, A. K. and Phillips, A. L.** (1995) 'Gibberellin-regulated plant genes', *Physiologia Plantarum*, 95(2), pp. 310-317.
- Indrasumunar, A., Searle, I., Lin, M. H., Kereszt, A., Men, A., Carroll, B. J. and Gresshoff, P. M.** (2011) 'Nodulation factor receptor kinase 1 α controls nodule organ number in soybean (*Glycine max L. Merr*)', *Plant Journal*, 65(1), pp. 39-50.
- Ingrosso, I., Bonsegna, S., De Domenico, S., Laddomada, B., Blando, F., Santino, A. and Giovino, G.** (2011) 'Over-expression of a grape stilbene synthase gene in tomato induces parthenocarpy and causes abnormal pollen development', *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(10), pp. 1092-1099.
- IPCC**, Change, I.P.f.C. (2014) *Climate Change Synthesis Report*.
- Jacobsen, S. E. and Olszewski, N. E.** (1993) 'Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction', *The Plant Cell*, 5(8), pp. 887-896.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N. and Jubin, C.** (2007) 'The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla', *nature*, 449(7161), pp. 463-467.
- James, R. A., Davenport, R. J. and Munns, R.** (2006) 'Physiological characterization of two genes for Na⁺ exclusion in durum wheat, *Nax1* and *Nax2*', *Plant Physiology*, 142(4), pp. 1537-1547.
- Jenkins, J. A.** (1948) 'The origin of the cultivated tomato', *Economic Botany*, 2(4), pp. 379-392.

- Jensen, A. B., Raventos, D. and Mundy, J.** (2002) 'Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in Arabidopsis', *The Plant Journal*, 29(5), pp. 595-606.
- Jeon, J. S., Lee, S., Jung, K. H., Jun, S. H., Jeong, D. H., Lee, J., Kim, C., Jang, S., Lee, S. and Yang, K.** (2000) 'T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice', *The Plant Journal*, 22(6), pp. 561-570.
- Jiang, S.-Y. and Ramachandran, S.** (2010) 'Natural and artificial mutants as valuable resources for functional genomics and molecular breeding', *International journal of biological sciences*, 6(3), pp. 228.
- Jiang, Z., Zhu, S., Ye, R., Xue, Y., Chen, A., An, L. and Pei, Z.-M.** (2013) 'Relationship between NaCl- and H₂O₂ induced cytosolic Ca²⁺ increases in response to stress in arabidopsis', *PLoS ONE*, 8(10), pp. e76130.
- Jin, Y., Ni, D.-A. and Ruan, Y.-L.** (2009) 'Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level', *The Plant Cell Online*, 21(7), pp. 2072-2089.
- Johnson, K. L. and Ingram, G. C.** (2005) 'Sending the right signals: regulating receptor kinase activity', *Current opinion in plant biology*, 8(6), pp. 648-656.
- Karapanos, I., Mahmood, S. and Thanopoulos, C.** (2008) 'Fruit set in Solanaceous vegetable crops as affected by floral and enviromental factors', *The European Journal of plant Science and Biotechnology*, 2 (Special issue 1), pp. 88-105.
- Kataoka, K., Uemachi, A. and Yazawa, S.** (2003) 'Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in *pat-2* and auxin-induced parthenocarpic tomato fruits', *Scientia Horticulturae*, 98(1), pp. 9-16.
- Kaur, R., Singh, K. and Singh, J.** (2013) 'A root-specific wall-associated kinase gene, *HvWAK1*, regulates root growth and is highly divergent in barley and other cereals', *Functional & Integrative Genomics*, 13(2), pp. 167-177.
- Kertbundit, S., De Greve, H., Deboeck, F., Van Montagu, M. and Hernalsteens, J.-P.** (1991) 'In vivo random beta-glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(12), pp. 5212-5216.
- Khurana, P. and Gaikwad, K.** (2005) 'The map-based sequence of the rice genome', *Nature*, 436, pp. 793-800.

- Kiegle, E., Moore, C. A., Haseloff, J., Tester, M. A. and Knight, M. R.** (2000) 'Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the Arabidopsis root', *Plant Journal*, 23(2), pp. 267-278.
- Klee, H. J. and Giovannoni, J. J.** (2011) 'Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes', *Annual Review of Genetics*, 45(1), pp. 41-59.
- Klimyuk, V., Nussaume, L., Harrison, K. and Jones, J.** (1995) 'Novel GUS expression patterns following transposition of an enhancer trap Ds element in Arabidopsis', *Molecular and General Genetics MGG*, 249(4), pp. 357-365.
- Koch, K.** (2004) 'Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development', *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), pp. 235-246.
- Kohorn, B. D., Johansen, S., Shishido, A., Todorova, T., Martinez, R., Defeo, E. and Obregon, P.** (2009) 'Pectin activation of MAP kinase and gene expression is *WAK2* dependent', *The Plant Journal*, 60(6), pp. 974-982.
- Kohorn, B. D., Kobayashi, M., Johansen, S., Friedman, H. P., Fischer, A. and Byers, N.** (2006a) '*Wall-associated kinase 1 (WAK1)* is crosslinked in endomembranes, and transport to the cell surface requires correct cell-wall synthesis', *Journal of cell science*, 119(11), pp. 2282-2290.
- Kohorn, B. D., Kobayashi, M., Johansen, S., Riese, J., Huang, L.-F., Koch, K., Fu, S., Dotson, A. and Byers, N.** (2006b) 'An Arabidopsis cell wall-associated kinase required for invertase activity and cell growth', *The Plant Journal*, 46(2), pp. 307-316.
- Kohorn, B. D. and Kohorn, S. L.** (2012) 'The cell wall-associated kinases, WAKs, as pectin receptors', *Front Plant Sci*, 3, pp. 88.
- Kohorn, B. D., Kohorn, S. L., Saba, N. J. and Meco-Martinez, V.** (2014) 'Requirement for pectin methyl esterase and preference for fragmented over native pectins for wall-associated kinase-activated, *EDS1/PAD4*-dependent stress response in Arabidopsis', *J Biol Chem*, 289(27), pp. 18978-86.
- Kohorn, B. D., Kohorn, S. L., Todorova, T., Baptiste, G., Stansky, K. and McCullough, M.** (2012) 'A dominant allele of arabidopsis pectin-binding Wall-Associated Kinase induces a stress response suppressed by MPK6 but not MPK3 mutations', *Molecular Plant*, 5(4), pp. 841-851.
- Krebs, M., Beyhl, D., Görlich, E., Al-Rasheid, K. A. S., Marten, I., Stierhof, Y. D., Hedrich, R. and Schumacher, K.** (2010) 'Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium

- accumulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), pp. 3251-3256.
- Krysan, P. J., Young, J. C. and Sussman, M. R.** (1999) 'T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis', *The Plant Cell Online*, 11(12), pp. 2283-2290.
- Kumar, R., Khurana, A. and Sharma, A. K.** (2014) 'Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits', *Journal of Experimental Botany*, 65(16), pp. 4561-4575.
- Kuromori, T., Takahashi, S., Kondou, Y., Shinozaki, K. and Matsui, M.** (2009) 'Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants', *Plant and cell physiology*, 50(7), pp. 1215-1231.
- Kurusu, T., Kuchitsu, K., Nakano, M., Nakayama, Y. and Iida, H.** (2013) 'Plant mechanosensing and Ca²⁺ transport', *Trends in Plant Science*, 18(4), pp. 227-233.
- Lally, D., Ingmire, P., Tong, H.-Y. and He, Z.-H.** (2001) 'Antisense expression of a Cell Wall-Associated protein kinase, *WAK4*, inhibits cell elongation and alters morphology', *The Plant Cell Online*, 13(6), pp. 1317-1332.
- Laohavisit, A., Richards, S. L., Shabala, L., Chen, C., Colaço, R. D. D. R., Swarbreck, S. M., Shaw, E., Dark, A., Shabala, S., Shang, Z. and Davies, J. M.** (2013) 'Salinity-induced calcium signaling and root adaptation in arabidopsis require the calcium regulatory protein annexin1', *Plant Physiology*, 163(1), pp. 253-262.
- Laohavisit, A., Shang, Z., Rubio, L., Cuin, T. A., Véry, A., Wang, A., Mortimer, J. C., Macpherson, N., Coxon, K. M., Battey, N. H., Brownlee, C., Park, O. K., Sentenac, H., Shabala, S., Webb, A. A. R. and Davies, J. M.** (2012) 'Arabidopsis annexin1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca²⁺-and K⁺-permeable conductance in root cells', *Plant Cell*, 24(4), pp. 1522-1533.
- Larkin, P. J. and Scowcroft, W. R.** (1981) 'Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement', *Theoretical and Applied Genetics*, 60(4), pp. 197-214.
- Laurie, C. C., Chasalow, S. D., LeDeaux, J. R., McCarroll, R., Bush, D., Hauge, B., Lai, C., Clark, D., Rocheford, T. R. and Dudley, J. W.** (2004) 'The genetic architecture of response to long-term artificial selection for oil concentration in the Maize Kernel', *Genetics*, 168(4), pp. 2141-2155.

- Lehti-Shiu, M. D., Zou, C., Hanada, K. and Shiu, S. H.** (2009) 'Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes', *Plant Physiology*, 150(1), pp. 12-26.
- Leidi, E. O., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M. T., Cubero, B., Fernández, J. A., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. and Quintero, F. J.** (2010) 'The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato', *The Plant Journal*, 61(3), pp. 495-506.
- Lejeune, A., Constant, S., Delavault, P., Simier, P., Thalouarn, P. and Thoiron, S.** (2006) 'Involvement of a putative *Lycopersicon esculentum* wall-associated kinase in the early steps of tomato–*Orobancha ramosa* interaction', *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(1–3), pp. 3-12.
- Lemaire-Chamley, M., Petit, J., Garcia, V., Just, D., Baldet, P., Germain, V., Fagard, M., Mouassite, M., Cheniclet, C. and Rothan, C.** (2005) 'Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato', *Plant Physiology*, 139(2), pp. 750-769.
- Li, H., Zhou, S.-Y., Zhao, W.-S., Su, S.-C. and Peng, Y.-L.** (2009) 'A novel wall-associated receptor-like protein kinase gene, *OsWAK1*, plays important roles in rice blast disease resistance', *Plant molecular biology*, 69(3), pp. 337-346.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., Whalon, M. E., Pichersky, E. and Howe, G. A.** (2004) 'The Tomato Homolog of *CORONATINE-INSENSITIVE1* is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development', *The Plant Cell Online*, 16(1), pp. 126-143.
- Li, Y., Gao, D., Peng, S., Lu, G. and Li, S.** (2011) 'Photocatalytic hydrogen evolution over Pt/Cd 0.5 Zn 0.5 S from saltwater using glucose as electron donor: an investigation of the influence of electrolyte NaCl', *international journal of hydrogen energy*, 36(7), pp. 4291-4297.
- Lindsey, K., Wei, W., Clarke, M. C., McArdle, H. F., Rooke, L. M. and Topping, J. F.** (1993) 'Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants', *Transgenic research*, 2(1), pp. 33-47.
- Ling, Q., Huang, W. and Jarvis, P.** (2011) 'Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*', *Photosynthesis Research*, 107(2), pp. 209-214., Species Planatarium.
- 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(1), pp. 413-22.
- Liu, J., Van Eck, J., Cong, B. and Tanksley, S. D.** (2002) 'A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), pp. 13302-13306.
- Liu, Y., Liu, D., Zhang, H., Gao, H., Guo, X., Fu, X. and Zhang, A.** (2006) 'Isolation and characterisation of six putative wheat cell wall-associated kinases', *Functional Plant Biology*, 33(9), pp. 811-821.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001) 'Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method', *Methods*, 25(4), pp. 402-408.
- Lou, Y., Gou, J.-Y. and Xue, H.-W.** (2007) '*PIP5K9*, an Arabidopsis Phosphatidylinositol Monophosphate Kinase, interacts with a cytosolic invertase to negatively regulate sugar-mediated root growth', *The Plant Cell*, 19(1), pp. 163-181.
- Lozano, R., Giménez, E., Cara, B., Capel, J. and Angosto, T.** (2009) 'Genetic analysis of reproductive development in tomato', *International Journal of Developmental Biology*, 53(8), pp. 1635.
- Lukyanenko, A.** (1991) 'Parthenocarpy in tomato', *Genetic improvement of tomato*: Springer, pp. 167-177.
- Maathuis, F. J.** (2014) 'Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes', *Journal of experimental botany*, 65(3), pp. 849-858.
- Maathuis, F. J. M.** (2006) 'cGMP modulates gene transcription and cation transport in Arabidopsis roots', *Plant Journal*, 45(5), pp. 700-711.
- MAGRAMA** (2010) *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Anuario 2010. Disponible en:*
www.magrama.gob.es/estadistica/pags/anuario/2010.
- Mahakun, N., Leeper, P. and Burns, E.** (1979) 'Acidic constituents of various tomato fruit types', *Journal of Food Science*, 44(4), pp. 1241-1244.
- Malamy, J. E. and Benfey, P. N.** (1997) 'Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*', *Development*, 124(1), pp. 33-44.
- Mapelli, S.** (1981) 'Changes in cytokinin in the fruits of parthenocarpic and normal tomatoes', *Plant Science Letters*, 22(3), pp. 227-233.
- Mapelli, S., Frova, C., Torti, G. and Soressi, G.** (1978) 'Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits', *Plant and Cell Physiology*, 19(7), pp. 1281-1288.

- Martí, C., Orzáez, D., Ellul, P., Moreno, V., Carbonell, J. and Granell, A.** (2007) 'Silencing of *DELLA* induces facultative parthenocarpy in tomato fruits', *The Plant Journal*, 52(5), pp. 865-876.
- Martí, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S. and García-Martínez, J. L.** (2006) 'Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom', *Journal of Experimental Botany*, 57(9), pp. 2037-2047.
- Martí, M. C., Stancombe, M. A. and Webb, A. A. R.** (2013) 'Cell-and stimulus type-specific intracellular free Ca^{2+} signals in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 163(2), pp. 625-634.
- Martienssen, R. A.** (1998) 'Functional genomics: probing plant gene function and expression with transposons', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), pp. 2021-2026.
- Martinelli, F., Uratsu, S. L., Reagan, R. L., Chen, Y., Tricoli, D., Fiehn, O., Rocke, D. M., Gasser, C. S. and Dandekar, A. M.** (2009) 'Gene regulation in parthenocarpic tomato fruit', *Journal of experimental botany*, pp. erp227.
- Martínez-Solano, J., Sánchez-Bel, P., Egea, I., Olmos, E., Hellín, E. and Romojaro, F.** (2005) 'Electron beam ionization induced oxidative enzymatic activities in pepper (*Capsicum annuum* L.), associated with ultrastructure cellular damages', *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(22), pp. 8593-8599.
- Mascarenhas, J. P.** (1993) 'Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation', *The Plant Cell*, 5(10), pp. 1303-1314.
- Matas, A. J., Gapper, N. E., Chung, M.-Y., Giovannoni, J. J. and Rose, J. K.** (2009) 'Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life', *Current opinion in biotechnology*, 20(2), pp. 197-203.
- Mazzucato, A., Taddei, A. R. and Soressi, G. P.** (1998) 'The parthenocarpic fruit (*pat*) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development', *Development*, 125(1), pp. 107-114.
- McGuire, S.** (2013) 'Jonathan Harwood. Europe's Green Revolution and Others Since: The rise and fall of peasant-friendly plant breeding', *Food Security*, 5(5), pp. 743-746.
- Medina, M., Roque, E., Pineda, B., Cañas, L., Rodríguez-Concepción, M., Beltrán, J. P. and Gómez-Mena, C.** (2013) 'Early anther ablation triggers parthenocarpic fruit development in tomato', *Plant Biotechnology Journal*, 11(6), pp. 770-779.

- Meier, S., Ruzvidzo, O., Morse, M., Donaldson, L., Kwezi, L. and Gehring, C.** (2010) 'The Arabidopsis *Wall Associated Kinase-Like 10* gene encodes a functional guanylyl cyclase and is co-expressed with pathogen defense related genes', *PLoS ONE*, 5(1), pp. e8904.
- Meissner, R., Chague, V., Zhu, Q., Emmanuel, E., Elkind, Y. and Levy, A. A.** (2000) 'A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato', *The Plant Journal*, 22(3), pp. 265-274.
- Meyerowitz, E. M., Bowman, J. L., Brockman, L. L., Drews, G. N., Jack, T., Sieburth, L. E. and Weigel, D.** (1991) 'A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*', *Development*, 113(Supplement 1), pp. 157-167.
- Mézard, C.** (2006) 'Meiotic recombination hotspots in plants', *Biochemical Society transactions*, 34(4), pp. 531-4.
- Mezzetti, B., Landi, L., Pandolfini, T. and Spena, A.** (2004) 'The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry', *BMC Biotechnology*, 4, pp. 4-4., The gardeners Dictionary.
- Miyatake, K., Saito, T., Negoro, S., Yamaguchi, H., Nunome, T., Ohyama, A. and Fukuoka, H.** (2012) 'Development of selective markers linked to a major QTL for parthenocarpy in eggplant (*Solanum melongena* L.)', *Theoretical and Applied Genetics*, 124(8), pp. 1403-1413.
- Mizuno, S., Osakabe, Y., Maruyama, K., Ito, T., Osakabe, K., Sato, T., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2007) 'Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Journal*, 50(5), pp. 751-766.
- Moco, S., Bino, R. J., Vorst, O., Verhoeven, H. A., de Groot, J., van Beek, T. A., Vervoort, J. and De Vos, C. R.** (2006) 'A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato', *Plant Physiology*, 141(4), pp. 1205-1218.
- Moghaieb, R. E., Nakamura, A., Saneoka, H. and Fujita, K.** (2011) 'Evaluation of salt tolerance in ectoine-transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in terms of photosynthesis, osmotic adjustment, and carbon partitioning', *GM crops*, 2(1), pp. 58-65.
- Molesini, B., Pandolfini, T., Rotino, G. L., Dani, V. and Spena, A.** (2009) '*Aucsia* gene silencing causes parthenocarpic fruit development in Tomato', *Plant Physiology*, 149(1), pp. 534-548.

- Molinero-Rosales, N., Jamilena, M., Zurita, S., Gómez, P., Capel, J. and Lozano, R.** (1999) '*FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and floral meristem identity', *The Plant Journal*, 20(6), pp. 685-693.
- Møller, I. S., Gilliam, M., Jha, D., Mayo, G. M., Roy, S. J., Coates, J. C., Haseloff, J. and Tester, M.** (2009) 'Shoot Na⁺ exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na⁺ transport in *Arabidopsis*', *Plant Cell*, 21(7), pp. 2163-2178.
- Mollier, P., Hoffmann, B., Orsel, M. and Pelletier, G.** (2000) 'Tagging of a cryptic promoter that confers root-specific gus expression in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Cell Reports*, 19(11), pp. 1076-1083.
- Mounet, F., Moing, A., Kowalczyk, M., Rohrmann, J., Petit, J., Garcia, V., Maucourt, M., Yano, K., Deborde, C., Aoki, K., Bergès, H., Granell, A., Fernie, A. R., Bellini, C., Rothan, C. and Lemaire-Chamley, M.** (2012) 'Down-regulation of a single auxin efflux transport protein in tomato induces precocious fruit development', *Journal of Experimental Botany*, 63(13), pp. 4901-4917.
- Munns, R. and Tester, M.** (2008) 'Mechanisms of Salinity Tolerance', *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), pp. 651-681.
- Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., Garcia-Abellán, J. O., Antón, T., Garcia-Sogo, B., Sanchez-Bel, P., Flores, F. B., Atarés, A., Angosto, T., Pintor-Toro, J. A., Moreno, V. and Bolarin, M. C.** (2012) 'Overexpression of *dehydrin tas14* gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato', *Journal of Plant Physiology*, 169(5), pp. 459-468.
- Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., Garcia-Abellán, J. O., Garcia-Sogo, B., Moyano, E., Atares, A., Vicente-Agulló, F., Serrano, R., Moreno, V. and Bolarin, M. C.** (2008) 'The *HAL1* function on Na⁺ homeostasis is maintained over time in salt-treated transgenic tomato plants, but the high reduction of Na⁺ in leaf is not associated with salt tolerance', *Physiologia plantarum*, 133(2), pp. 288-297.
- Narsai, R., Wang, C., Chen, J., Wu, J., Shou, H. and Whelan, J.** (2013) 'Antagonistic, overlapping and distinct responses to biotic stress in rice (*Oryza sativa*) and interactions with abiotic stress', *BMC Genomics*, 14(1), pp. 93.

- Nelson, D. E., Koukoumanos, M. and Bohnert, H. J.** (1999) 'Myo-inositol-dependent sodium uptake in ice plant', *Plant Physiology*, 119(1), pp. 165-172.
- Nelson, D. E., Rammesmayr, G. and Bohnert, H. J.** (1998) 'Regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance', *The Plant Cell Online*, 10(5), pp. 753-764.
- Nesbitt, T. C. and Tanksley, S. D.** (2002) 'Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes', *Genetics*, 162(1), pp. 365-379.
- Nguyen, M. L., Schwartz, S.J** (1999) 'Lycopene: Chemical and biological properties. Developing nutraceuticals for the new millenium', *Food Technol*, 53 pp. 38-45.
- Nitsch, L., Kohlen, W., Oplaat, C., Charnikhova, T., Cristescu, S., Michieli, P., Wolters-Arts, M., Bouwmeester, H., Mariani, C. and Vriezen, W.** (2012) 'ABA-deficiency results in reduced plant and fruit size in tomato', *Journal of plant physiology*, 169(9), pp. 878-883.
- Nuez, F.** (1995) *El Cultivo del tomate*. Mundi-Prensa.
- Nuez F. , C. J. y. C. J.** (1986) 'Genetics of the parthenocarpy for tomato varieties sub-arctic plenty, *75/59* and *severianin*', *Zeitschrift Fur Pflanzenzuchtung-Journal of Plant Breeding*, 96, pp. 200-206.
- Okabe, Y., Asamizu, E., Saito, T., Matsukura, C., Ariizumi, T., Brès, C., Rothan, C., Mizoguchi, T. and Ezura, H.** (2011) 'Tomato TILLING Technology: Development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries', *Plant and Cell Physiology*, 52(11), pp. 1994-2005.
- Olías, R., Eljakaoui, Z., Pardo, J. M. and Belver, A.** (2009) 'The Na⁺/H⁺ exchanger SOS1 controls extrusion and distribution of Na⁺ in tomato plants under salinity conditions', *Plant signaling & behavior*, 4(10), pp. 973-976.
- Olimpieri, I., Siligato, F., Caccia, R., Soressi, G., Mazzucato, A., Mariotti, L. and Ceccarelli, N.** (2007) 'Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis', *Planta*, 226(4), pp. 877-888.
- ONU** (2012) 'UN World Population Prospects '. Available at: www.unpopulation.org.
- Osakabe, Y., Maruyama, K., Seki, M., Satou, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2005) 'Leucine-rich repeat receptor-like kinasel is a key

- membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in arabidopsis', *Plant Cell*, 17(4), pp. 1105-1119.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. and Tran, L.-S. P.** (2014) 'Response of plants to water stress', *Frontiers in plant science*, 5.
- Osorio, S., Alba, R., Damasceno, C. M. B., Lopez-Casado, G., Lohse, M., Zanon, M. I., Tohge, T., Usadel, B., Rose, J. K. C., Fei, Z., Giovannoni, J. J. and Fernie, A. R.** (2011) 'Systems biology of tomato fruit development: Combined transcript, protein, and metabolite analysis of Tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions', *Plant Physiology*, 157(1), pp. 405-425.
- Osorio, S., Alba, R., Nikoloski, Z., Kochevenko, A., Fernie, A. R. and Giovannoni, J. J.** (2012) 'Integrative comparative analyses of transcript and metabolite profiles from pepper and tomato ripening and development stages uncovers species-specific patterns of network regulatory behavior', *Plant Physiology*, 159(4), pp. 1713-1729.
- Østergaard, L. and Yanofsky, M. F.** (2004) 'Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*', *The Plant Journal*, 39(5), pp. 682-696.
- Ozga, J. A., Yu, J. and Reinecke, D. M.** (2003) 'Pollination-, development-, and Auxin-Specific regulation of *Gibberellin 3 β -Hydroxylase* Gene expression in Pea fruit and seeds', *Plant Physiology*, 131(3), pp. 1137-1146.
- Pandolfini, T., Molesini, B. and Spena, A.** (2007) 'Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation', *Trends in plant science*, 12(8), pp. 327-329.
- Pandolfini, T., Rotino, G. L., Camerini, S., Defez, R. and Spena, A.** (2002) 'Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes', *BMC Biotechnology*, 2, pp. 1-1.
- Paran, I., Goldman, I., Tanksley, S. D. and Zamir, D.** (1995) 'Recombinant inbred lines for genetic mapping in tomato', *Theoretical and applied genetics*, 90(3-4), pp. 542-8.
- Park, A. R., Cho, S. K., Yun, U. J., Jin, M. Y., Lee, S. H., Sachetto-Martins, G. and Park, O. K.** (2001) 'Interaction of the Arabidopsis receptor protein kinase Wak1 with a glycine-rich protein, AtGRP-3', *Journal of Biological Chemistry*, 276(28), pp. 26688-26693.
- Pascual-Bañuls, L.** (2010) Análisis del cuajado y desarrollo partenocárpico del fruto en solanáceas: Identificación de genes implicados. Universidad Politecnica de Valencia, Valencia.

- Pascual, L., Blanca, J., Canizares, J. and Nuez, F.** (2007) 'Analysis of gene expression during the fruit set of tomato: a comparative approach', *Plant science*, 173(6), pp. 609-620.
- Pascual, L., Blanca, J., Cañizares, J. and 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(1), pp. 1-18.
- Patra, B., Ray, S., Richter, A. and Majumder, A.** (2010) 'Enhanced salt tolerance of transgenic tobacco plants by co-expression of *PcINO1* and *McIMT1* is accompanied by increased level of myo-inositol and methylated inositol', *Protoplasma*, 245(1-4), pp. 143-152.
- Pattison, R. J. and Catalá, C.** (2012) 'Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the *PIN* and *AUX/LAX* gene families', *The Plant Journal*, 70(4), pp. 585-598.
- Peng, H., Huang, H., Yang, Y., Zhai, Y., Wu, J., Huang, D. and Lu, T.** (2005) 'Functional analysis of GUS expression patterns and T-DNA integration characteristics in rice enhancer trap lines', *Plant science*, 168(6), pp. 1571-1579.
- Peralta, I. E., Knapp, S. and Spooner, D. M.** (2005) 'New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru', *Systematic Botany*, 30(2), pp. 424-434.
- Peralta, I. E., Spooner, D. M., Razdan, M. and Mattoo, A.** (2007) 'History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae)', *Genetic improvement of solanaceous crops*, 2, pp. 1-27.
- Peshev, D., Vergauwen, R., Moglia, A., Hideg, É. and Van den Ende, W.** (2013) 'Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans?', *Journal of Experimental Botany*.
- Pharis, R. P. and King, R. W.** (1985) 'Gibberellins and reproductive development in seed plants', *Annual Review of Plant Physiology*, 36(1), pp. 517-568.
- Philouze, J.** (1983) 'Parthénocarpiе naturelle chez la tomate. I. - Revue bibliographique', *Agronomie*, 3(7), pp. 611-620.
- Philouze, J. and Milesi, M.** (1985) 'Parthénocarpiе naturelle chez la tomate. II. - Etude d'une collection variétale', *Agronomie*, 5(1), pp. 47-54.
- Philouze, J. and Milesi, M.** (1989) 'Parthénocarpiе naturelle chez la tomate. IV. Etude de la parthénocarpiе à déterminisme polygénique de la lignée «75/59»', *Agronomie*, 9(1), pp. 63-75.

- Pineda, B., García-Abellán, J. O., Antón, T., Pérez, F., Moyano, E., García Sogo, B., Campos, J. F., Angosto, T., Morales, B., Capel, J., Moreno, V., Lozano, R., Bolarín, M. C. and Atarés, A.** (2012) 'Tomato: Genomic approaches for salt and drought stress tolerance', *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1085-1120.
- Plesch, G., Kamann, E. and Mueller-Roeber, B.** (2000) 'Cloning of regulatory sequences mediating guard-cell-specific gene expression', *Gene*, 249(1), pp. 83-89.
- Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganal, M., Zamir, D. and Lifschitz, E.** (1998) 'The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*', *Development*, 125(11), pp. 1979-1989.
- Proels, R. K. and Roitsch, T.** (2009) 'Extracellular invertase *LIN6* of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by a diurnal rhythm', *Journal of Experimental Botany*, 60(6), pp. 1555-1567.
- Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S. and Zhu, J. K.** (2002) 'Regulation of *SOS1*, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by *SOS2* and *SOS3*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), pp. 8436-8441.
- Raza, S. H., Athar, H. R., Ashraf, M. and Hameed, A.** (2007) 'Glycinebetaine-induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance', *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), pp. 368-376.
- Ren, Z., Li, Z., Miao, Q., Yang, Y., Deng, W. and Hao, Y.** (2011) 'The auxin receptor homologue in *Solanum lycopersicum* stimulates tomato fruit set and leaf morphogenesis', *Journal of Experimental Botany*, 62(8), pp. 2815-2826.
- Ren, Z. H., Gao, J. P., Li, L. G., Cai, X. L., Huang, W., Chao, D. Y., Zhu, M. Z., Wang, Z. Y., Luan, S. and Lin, H. X.** (2005) 'A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter', *Nature Genetics*, 37(10), pp. 1141-1146.
- Rick, C. M.** (1960) 'Hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii*: phylogenetic and cytogenetic significance', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(1), pp. 78.
- Ringli, C.** (2010) 'Monitoring the Outside: Cell Wall-Sensing Mechanisms', *Plant Physiology*, 153(4), pp. 1445-1452.

- Roelfsema, M. R. G. and Hedrich, R.** (2010) 'Making sense out of Ca²⁺ signals: their role in regulating stomatal movements', *Plant, Cell & Environment*, 33(3), pp. 305-321.
- Rogers, J. C., Dean, D. and Heck, G. R.** (1985) 'Aleurain: a barley thiol protease closely related to mammalian cathepsin H', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(19), pp. 6512-6516.
- Roitsch, T., Balibrea, M., Hofmann, M., Proels, R. and Sinha, A.** (2003) 'Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein', *Journal of Experimental Botany*, 54(382), pp. 513-524.
- Roitsch, T. and González, M.-C.** (2004) 'Function and regulation of plant invertases: sweet sensations', *Trends in plant science*, 9(12), pp. 606-613.
- Rojas, E. R., Hotton, S. and Dumais, J.** (2011) 'Chemically mediated mechanical expansion of the pollen tube cell wall', *Biophysical journal*, 101(8), pp. 1844-1853.
- Rosenzweig, C. and Parry, M. L.** (1994) 'Potential impact of climate change on world food supply', *Nature*, 367(6459), pp. 133-138.
- Rosli, H. G., Zheng, Y., Pombo, M. A., Zhong, S., Bombarely, A., Fei, Z., Collmer, A. and Martin, G. B.** (2013) 'Transcriptomics-based screen for genes induced by flagellin and repressed by pathogen effectors identifies a cell wall-associated kinase involved in plant immunity', *Genome biology*, 14(12), pp. R139.
- Ross, J. J., O'Neill, D. P., Smith, J. J., Kerckhoffs, L. H. J. and Elliott, R. C.** (2000) 'Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea', *The Plant Journal*, 21(6), pp. 547-552.
- Rotino, G. L., Acciarri, N., Sabatini, E., Mennella, G., Lo Scalzo, R., Maestrelli, A., Molesini, B., Pandolfini, T., Scalzo, J., Mezzetti, B. and Spena, A.** (2005) 'Open field trial of genetically modified parthenocarpic tomato: seedlessness and fruit quality', *BMC Biotechnology*, 5, pp. 32-32.
- Rotino, G. L., Perri, E., Zottini, M., Sommer, H. and Spena, A.** (1997) 'Genetic engineering of parthenocarpic plants', *Nat Biotech*, 15(13), pp. 1398-1401.
- Ruan, Y.-L., Jin, Y., Yang, Y.-J., Li, G.-J. and Boyer, J. S.** (2010) 'Sugar input, metabolism and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential and response to drought and heat| NOVA. The University of Newcastle's Digital Repository'.
- Rus, A., Estan, M., Gisbert, C., Garcia-Sogo, B., Serrano, R., Caro, M., Moreno, V. and Bolarin, M.** (2001) 'Expressing the yeast *HAL1* gene in tomato increases

- fruit yield and enhances K^+/Na^+ selectivity under salt stress', *Plant, Cell & Environment*, 24(8), pp. 875-880.
- Sabeti, P. C., Varilly, P., Fry, B., Lohmueller, J., Hostetter, E., Cotsapas, C., Xie, X., Byrne, E. H., McCarroll, S. A., Gaudet, R., Schaffner, S. F. and Lander, E. S.** (2007) 'Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations', *Nature*, 449(7164), pp. 913-918.
- Sagi, M., Scazzocchio, C. and Fluhr, R.** (2002) 'The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants', *The Plant Journal*, 31(3), pp. 305-317.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. and Arnheim, N.** (1985) 'Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia', *Science*, 230(4732), pp. 1350-1354.
- Saito, T., Ariizumi, T., Okabe, Y., Asamizu, E., Hiwasa-Tanase, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Yamazaki, Y., Aoki, K. and Ezura, H.** (2011) 'TOMATOMA: a novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections', *Plant and cell physiology*, 52(2), pp. 283-296.
- Sakamoto, T., Deguchi, M., Brustolini, O. J., Santos, A. A., Silva, F. F. and Fontes, E. P.** (2012) 'The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-II-RLK subfamily in antiviral defense', *BMC plant biology*, 12(1), pp. 229.
- Salehin, M., Bagchi, R. and Estelle, M.** (2015) 'SCFTIR1/AFB-Based Auxin perception: Mechanism and role in plant growth and development', *The Plant Cell Online*.
- Sallaud, C., Gay, C., Larmande, P., Bes, M., Piffanelli, P., Piegu, B., Droc, G., Regad, F., Bourgeois, E. and Meynard, D.** (2004) 'High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics', *The Plant Journal*, 39(3), pp. 450-464.
- Sambrook, J. and Russell, D. W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Bel, P., Egea, I., Sánchez-Ballesta, M. T., Martínez-Madrid, C., Fernández-García, N., Romojaro, F., Olmos, E., Estrella, E., Bolarín, M. C. and Flores, F. B.** (2012) 'Understanding the mechanisms of chilling injury in bell pepper fruits using the proteomic approach', *Journal of Proteomics*, 75(17), pp. 5463-5478.

- Sanchez-Bel, P., Egea, I., Sanchez-Ballesta, M. T., Sevillano, L., Bolarin, M.C. and Flores, F. B.** (2012) 'Proteome changes in tomato fruits prior to visible symptoms of chilling injury are linked to defensive mechanisms, uncoupling of photosynthetic processes and protein degradation machinery', *Plant and Cell Physiology*, 53(2), pp. 470-484.
- Sauer, N.** (2007) 'Molecular physiology of higher plant sucrose transporters', *FEBS Letters*, 581(12), pp. 2309-2317.
- Sawhney, V. K. and Shukla, A.** (1994) 'Male sterility in flowering plants: are plant growth substances involved?', *American Journal of Botany*, pp. 1640-1647.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C. and Manners, J. M.** (2000) 'Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), pp. 11655-11660.
- Scholander, P. F., Hammel, H., Hemmingsen, E. and Bradstreet, E.** (1964) 'Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 52(1), pp. 119.
- Schupp, J., Price, L., Klevytska, A. and Keim, P.** (1999) 'Internal and flanking sequence from AFLP fragments using ligation-mediated suppression PCR', *BioTechniques*, 26(5), pp. 905-10, 912.
- Schwabe, W.** 'Hormones and parthenocarpic fruit set, a literature survey'. *Hortic. Abstr.*, 661-698.
- Schwimmer, S., Makower, R. U. and Rorem, E. S.** (1961) 'Invertase & invertase inhibitor in potato', *Plant physiology*, 36(3), pp. 313.
- Sergeeva, L. I., Keurentjes, J. J., Bentsink, L., Vonk, J., van der Plas, L. H., Koornneef, M. and Vreugdenhil, D.** (2006) 'Vacuolar invertase regulates elongation of *Arabidopsis thaliana* roots as revealed by QTL and mutant analysis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), pp. 2994-2999.
- Serrani, J. C., Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Gallego-Giraldo, L., Peres, L. E. P. and Garcia-Martinez, J. L.** (2010) 'Inhibition of auxin transport from the ovary or from the apical shoot induces parthenocarpic fruit-set in Tomato mediated by Gibberellins', *Plant Physiology*.
- Serrani, J. C., Fos, M., Atarés, A. and García-Martínez, J. L.** (2007a) 'Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv

- Micro-Tom of tomato', *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), pp. 211-221.
- 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), pp. 922-934.
- Serrani, J. C., Sanjuán, R., Ruiz-Rivero, O., Fos, M. and García-Martínez, J. L.** (2007b) 'Gibberellin regulation of fruit set and growth in Tomato', *Plant Physiology*, 145(1), pp. 246-257.
- Shabala, S.** (2013) 'Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops', *Annals of Botany*, 112(7), pp. 1209-1221.
- Shabala, S. and Pottosin, I.** (2014) 'Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance', *Physiologia plantarum*, 151(3), pp. 257-279.
- Shackel, K. A., Greve, C., Labavitch, J. M. and Ahmadi, H.** (1991) 'Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue', *Plant Physiology*, 97(2), pp. 814-816.
- Shaik, R. and Ramakrishna, W.** (2014) 'Machine learning approaches distinguish multiple stress conditions using stress-responsive genes and identify candidate genes for broad resistance in rice', *Plant Physiol*, 164(1), pp. 481-95.
- Sharma A, Z. L., Nio-Liu D, Ashrafi H, Foolad MR** (2008) 'A *Solanum lycopersicum* *Solanum pimpinellifolium* linkage map of tomato displaying genomic locations of R-genes, RGAs, and candidate resistance/defense-response ESTs', *International journal of plant genomics*, 2008, pp. 1-18.
- Sharma, S. and Verslues, P. E.** (2010) 'Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery', *Plant, Cell and Environment*, 33(11), pp. 1838-1851.
- Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J. and Nguyen, H. T.** (2004) 'Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics', *Journal of Experimental Botany*, 55(407), pp. 2343-2351.
- Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F.-F., Sharon, M. and Browse, J.** (2010) 'Jasmonate

- perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor', *Nature*, 468(7322), pp. 400-405.
- Shelden, M. C. and Roessner, U.** (2013) 'Advances in functional genomics for investigating salinity stress tolerance mechanisms in cereals', *Frontiers in plant science*, 4.
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M. and Zhu, J.-K.** (2002) 'The putative plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 controls long-distance Na^+ transport in plants', *The Plant Cell Online*, 14(2), pp. 465-477.
- Shi, J. and Maguer, M. L.** (2000) 'Lycopene in Tomatoes: Chemical and Physical Properties Affected by Food Processing', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), pp. 1-42.
- Shiu, S.-H. and Bleecker, A. B.** (2001) 'Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), pp. 10763-10768.
- Shpak, E. D., Lakeman, M. B. and Torii, K. U.** (2003) 'Dominant-Negative Receptor Uncovers Redundancy in the Arabidopsis ERECTA Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase Signaling Pathway That Regulates Organ Shape', *The Plant Cell*, 15(5), pp. 1095-1110.
- Shu, Q.-Y., Forster, B. P., Nakagawa, H. and Nakagawa, H.** (2012) *Plant mutation breeding and biotechnology*. CABI.
- Shuai, B., Reynaga-Peña, C. G. and Springer, P. S.** (2002) 'The lateral organ boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family', *Plant physiology*, 129(2), pp. 747-761.
- Sim, S.-C., Durstewitz, G., Plieske, J., Wieseke, R., Ganai, M., Van Deynze, A., Hamilton, J., Buell, C. R., Causse, M., Wijeratne, S., Francis, D. and Yin, T.** (2012) 'Development of a large SNP genotyping array and generation of high-density genetic maps in Tomato', *PLoS ONE*, 7(7), pp. e40563.
- Sivaguru, M., Ezaki, B., He, Z.-H., Tong, H., Osawa, H., Baluška, F., Volkmann, D. and Matsumoto, H.** (2003) 'Aluminum-induced gene expression and protein localization of a Cell Wall-Associated Receptor Kinase in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 132(4), pp. 2256-2266.
- Smil, V.** (2004) Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food Production. *New Ed (1 de febrero de 2004)*.
- Smirnoff, N., Conklin, P. L. and Loewus, F. A.** (2001) 'Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance', *Annual review of plant biology*, 52(1), pp. 437-467.

- Soressi GP, S. F.** (1975) 'A monomendelian gene inducing parthenocarpic fruits', *Tomato Genetics Cooperative Reports*, 25, pp. 22.
- Spena, A. and Rotino, G.** (2001) 'Parthenocarpy', in Bhojwani, S. & Soh, W.-Y. (eds.) *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Springer Netherlands, pp. 435-450.
- Sponsel, V. M.** (1995) 'The biosynthesis and metabolism of gibberellins in higher plants', *Plant Hormones*. Springer, pp. 66-97.
- Springer, P. S.** (2000) 'Gene traps: tools for plant development and genomics', *The Plant Cell Online*, 12(7), pp. 1007-1020.
- Srivastava, A. and Handa, A. K.** (2005) 'Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective', *Journal of Plant Growth Regulation*, 24(2), pp. 67-82.
- Stewart, A. J., Bozonnet, S., Mullen, W., Jenkins, G. I., Lean, M. E. and Crozier, A.** (2000) 'Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), pp. 2663-2669.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K. and Parniske, M.** (2002) 'A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis', *Nature*, 417(6892), pp. 959-962.
- Sturm, A.** (1999) 'Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning', *Plant physiology*, 121(1), pp. 1-8.
- Su, L., Bassa, C., Audran, C., Mila, I., Cheniclet, C., Chevalier, C., Bouzayen, M., Roustan, J.-P. and Chervin, C.** (2014) 'The auxin *SI-IAA17* transcriptional repressor controls fruit size via the regulation of endoreduplication-related cell expansion', *Plant and Cell Physiology*, 55(11), pp. 1969-1976.
- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W. Y., Leung, H. Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., Schroeder, J. I. and Uozumi, N.** (2005) 'Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells', *Plant Journal*, 44(6), pp. 928-938.
- Sundaresan, V.** (1996) 'Horizontal spread of transposon mutagenesis: new uses for old elements', *Trends in Plant Science*, 1(6), pp. 184-190.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J. D., Dean, C., Ma, H. and Martienssen, R.** (1995) 'Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements', *Genes & development*, 9(14), pp. 1797-1810.

- Székely, G., Ábrahám, E., Cséplő, Á., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz, C. and Szabados, L.** (2008) 'Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis', *Plant Journal*, 53(1), pp. 11-28.
- Taiz, L. and Zeiger, E.** (2007) *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume I.
- Tapken, D. and Hollmann, M.** (2008) '*Arabidopsis thaliana* Glutamate receptor ion channel function demonstrated by Ion pore transplantation', *Journal of Molecular Biology*, 383(1), pp. 36-48.
- Tarczynski, M. C., Jensen, R. G. and Bohnert, H. J.** (1993) 'Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol', *Science*, 259(5094), pp. 508-510.
- Tester, M. and Davenport, R.** (2003) 'Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants', *Annals of botany*, 91(5), pp. 503-527.
- TFGD** 2015. Tomato Functional Genomics Database. University of Cornell.
- TGC, The Tomato Genome Consortium.** (2012) 'The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution', *Nature*, 485(7400), pp. 635-641.
- Thompson, K., Marshall, M., Sims, C., Wei, C., Sargent, S. and Scott, J.** (2000) 'Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes', *Journal of Food Science*, 65(5), pp. 791-795.
- Tiwari, K. and Paliyath, G.** (2011) 'Cloning, expression and functional characterization of the C2 domain from tomato phospholipase Dα', *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(1), pp. 18-32.
- Tocquard, K., Lafon-Placette, C., Auguin, D., Muries, B., Bronner, G., Lopez, D., Fumanal, B., Franchel, J., Bourgerie, S., Maury, S., Label, P., Julien, J.-L., Roeckel-Drevet, P. and Venisse, J.-S.** (2014) 'In silico study of wall-associated kinase family reveals large-scale genomic expansion potentially connected with functional diversification in *Populus*', *Tree Genetics & Genomes*, 10(5), pp. 1135-1147.
- Topping, J. F., Agyeman, F., Henricot, B. and Lindsey, K.** (1994) 'Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping', *The Plant Journal*, 5(6), pp. 895-903.
- Topping, J. F. and Lindsey, K.** (1995) 'Insertional mutagenesis and promoter trapping in plants for the isolation of genes and the study of development', *Transgenic research*, 4(5), pp. 291-305.

- Topping, J. F. and Lindsey, K.** (1997) 'Promoter trap markers differentiate structural and positional components of polar development in Arabidopsis', *The Plant Cell Online*, 9(10), pp. 1713-1725.
- Tracy, F. E., Gilliam, M., Dodd, A. N., Webb, A. A. R. and Tester, M.** (2008) 'NaCl-induced changes in cytosolic free Ca²⁺ in Arabidopsis thaliana are heterogeneous and modified by external ionic composition', *Plant, Cell and Environment*, 31(8), pp. 1063-1073.
- Turgeon, R. and Wolf, S.** (2009) 'Phloem transport: Cellular pathways and molecular trafficking', *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), pp. 207-221.
- Tyerman, S. D. and Skerrett, I.** (1998) 'Root ion channels and salinity', *Scientia Horticulturae*, 78(1), pp. 175-235.
- Valluru, R. and Van den Ende, W.** (2011) 'Myo-inositol and beyond – Emerging networks under stress', *Plant Science*, 181(4), pp. 387-400.
- Varoquaux, F., Blanvillain, R., Delseny, M. and Gallois, P.** (2000) 'Less is better: new approaches for seedless fruit production', *Trends in Biotechnology*, 18(6), pp. 233-242.
- Varshney, R., Bansal, K., Aggarwal, P., Datta, S. and Craufurd, P.** (2011) 'Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: hope or hype?', *Trends Plant Sci*, 16(7), pp. 363 - 371.
- Verica, J. A., Chae, L., Tong, H., Ingmire, P. and He, Z.-H.** (2003) 'Tissue-specific and developmentally regulated expression of a cluster of tandemly arrayed cell wall-associated kinase-like kinase genes in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 133(4), pp. 1732-1746.
- Verica, J. A. and He, Z.-H.** (2002) 'The *Cell Wall-Associated Kinase (WAK)* and *WAK-Like Kinase* Gene Family', *Plant Physiology*, 129(2), pp. 455-459.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. and Zhu, J. K.** (2006) 'Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status', *Plant Journal*, 45(4), pp. 523-539.
- Verslues, P. E. and Juenger, T. E.** (2011) 'Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments', *Current opinion in plant biology*, 14(3), pp. 240-245.
- Vij, S. and Tyagi, A. K.** (2007) 'Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants', *Plant Biotechnology Journal*, 5(3), pp. 361-380.

- Viquez Zamora, M., Vosman, B., van de Geest, H., Bovy, A., Visser, R., Finkers, R. and van Heusden, A.** (2013) 'Tomato breeding in the genomics era: insights from a SNP array', *BMC genomics*, 14(1), pp. 354.
- 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(1), pp. 60-76.
- Wagner, S., Stuttmann, J., Rietz, S., Guerois, R., Brunstein, E., Bautor, J., Niefind, K. and Parker, J. E.** (2013) 'Structural basis for signaling by exclusive *EDS1* heteromeric complexes with *SAG101* or *PAD4* in plant innate immunity', *Cell host & microbe*, 14(6), pp. 619-630.
- Wagner, T. A. and Kohorn, B. D.** (2001) 'Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion', *The Plant Cell Online*, 13(2), pp. 303-318.
- Wang, H., Jones, B., Li, Z., Frasse, P., Delalande, C., Regad, F., Chaabouni, S., Latché, A., Pech, J.-C. and Bouzayen, M.** (2005) 'The tomato Aux/IAA Transcription Factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis', *The Plant Cell*, 17(10), pp. 2676-2692.
- Wang, H., Schauer, N., Usadel, B., Frasse, P., Zouine, M., Hernould, M., Latché, A., Pech, J.-C., Fernie, A. R. and Bouzayen, M.** (2009) 'Regulatory features underlying pollination-dependent and-independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling', *The Plant Cell Online*, 21(5), pp. 1428-1452.
- Wang, L., Li, X.-R., Lian, H., Ni, D.-A., He, Y.-k., Chen, X.-Y. and Ruan, Y.-L.** (2010) 'Evidence That high activity of vacuolar invertase is required for cotton fiber and arabidopsis root elongation through osmotic dependent and independent pathways, respectively', *Plant Physiology*, 154(2), pp. 744-756.
- Wang, L. and Ruan, Y.-L.** (2013) 'Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling', *Frontiers in plant science*, 4.
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q. and Guo, S.** (2013) 'The critical role of potassium in plant stress response', *International journal of molecular sciences*, 14(4), pp. 7370-7390.
- Wang, Q.-M. and Wang, L.** (2012) 'An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection', *Plant Cell Reports*, 31(9), pp. 1535-1547.
- Wang, Z.-Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S. and Chory, J.** (2001) 'BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids', *Nature*, 410(6826), pp. 380-383.

- Wang, Z. Y., Xiong, L., Li, W., Zhu, J. K. and Zhu, J.** (2011) 'The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*', *Plant Cell*, 23(5), pp. 1971-1984.
- Webb, K. J., Skøt, L., Nicholson, M. N., Jørgensen, B. and Mizen, S.** (2000) '*Mesorhizobium loti* increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonicus*', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(6), pp. 606-616.
- Wei, W., Twell, D. and Lindsey, K.** (1997) 'A novel nucleic acid helicase gene identified by promoter trapping in *Arabidopsis*', *The Plant Journal*, 11(6), pp. 1307-1314.
- Weide, R., Koornneef, M. and Zabel, P.** (1989) 'A simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants', *Theoretical and Applied Genetics*, 78(2), pp. 169-172.
- Weschke, W., Panitz, R., Gubatz, S., Wang, Q., Radchuk, R., Weber, H. and Wobus, U.** (2003) 'The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development', *The Plant Journal*, 33(2), pp. 395-411.
- Wilson, L. A. and Sterling, C.** (1976) 'Studies on the cuticle of tomato fruit: I. Fine structure of the cuticle', *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 77(4), pp. 359-371.
- Williams, W. D.** (1999) 'Salinisation: A major threat to water resources in the arid and semi-arid regions of the world', *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 4(3-4), pp. 85-91.
- Wind, J., Smeekens, S. and Hanson, J.** (2010) 'Sucrose: Metabolite and signaling molecule', *Phytochemistry*, 71(14-15), pp. 1610-1614.
- Wright, S. I., Bi, I. V., Schroeder, S. G., Yamasaki, M., Doebley, J. F., McMullen, M. D. and Gaut, B. S.** (2005) 'The effects of artificial selection on the maize genome', *Science*, 308(5726), pp. 1310-1314.
- Wu, C., Li, X., Yuan, W., Chen, G., Kilian, A., Li, J., Xu, C., Li, X., Zhou, D. X. and Wang, S.** (2003) 'Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome', *The Plant Journal*, 35(3), pp. 418-427.
- Wu, G., Rossidivito, G., Hu, T., Berlyand, Y. and Poethig, R. S.** (2015) 'Traffic lines: New tools for genetic analysis in *Arabidopsis thaliana*', *Genetics*.
- Yamaguchi, T., Hamamoto, S. and Uozumi, N.** (2013) 'Sodium transport system in plant cells', *Frontiers in plant science*, 4.

- Yang, A., Duan, X., Gu, X., Gao, F. and Zhang, J.** (2005) 'Efficient transformation of beet (*Beta vulgaris*) and production of plants with improved salt-tolerance', *Plant cell, tissue and organ culture*, 83(3), pp. 259-270.
- Yin, Z., Malinowski, R., Ziółkowska, A., Sommer, H., Plcader, W. and Malepszy, S.** (2006). The DefH9-iaaM-containing construct efficiently induces parthenocarpy in cucumber. *Cellular and Molecular Biology Letters*.
- Yu, H., Ito, T., Zhao, Y., Peng, J., Kumar, P. and Meyerowitz, E. M.** (2004) 'Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), pp. 7827-7832.
- Zhang, D., Wang, Z., Wang, N., Gao, Y., Liu, Y., Wu, Y., Bai, Y., Zhang, Z., Lin, X., Dong, Y., Ou, X., Xu, C. and Liu, B.** (2014) 'Tissue culture-induced heritable genomic variation in rice, and their phenotypic implications', *PLoS ONE*, 9(5), pp. e96879.
- Zhang, S., Chen, C., Li, L., Meng, L., Singh, J., Jiang, N., Deng, X., He, Z. and Lemaux, P.** (2005) 'Evolutionary expansion, gene structure, and expression of the rice *wall-associated kinase* gene family', *Plant Physiol*, 139(3), pp. 1107 - 1124.
- Zhang, Y., Zhang, A. and Jiang, J.** (2013) 'Gene expression patterns of invertase gene families and modulation of the inhibitor gene in tomato sucrose metabolism', *Genet. Mol. Res*, 12, pp. 3412-3420.