

UCH-FC
Biotecnología
M 828a
C.1



ESCUELA DE PREGRADO FACULTAD DE CIENCIAS UNIVERSIDAD DE CHILE



**“ANÁLISIS FUNCIONAL DE *Vitis vinifera* AGAMOUS-like 11
EN EL DESARROLLO DE FLORES, FRUTOS Y SEMILLAS EN TOMATE”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

IGNACIO ANTONIO MORALES SOTO

Director de Seminario de Título: Dr. Nilo Mejía
Co – Director de Seminario de Título: Nallatt Ocaez Mancilla
Profesor Patrocinante: Dra. Claudia Stange Klein

Enero, 2016
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título, presentado por el señor Ignacio Antonio Morales Soto.

“ANÁLISIS FUNCIONAL DE *Vitis vinifera* AGAMOUS-like 11 EN EL DESARROLLO DE FLORES Y BAYAS Y SEMILLAS EN TOMATE”

Ha sido aprobado por la comisión evaluadora, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Nilo Mejía

Director Seminario de Título

Ing. Biotec. Molec. Nallatt Ocarez Mancilla

Co-Directora Seminario de Título

Dra. Claudia Stange Klein

Patrocinante

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Michael Handford

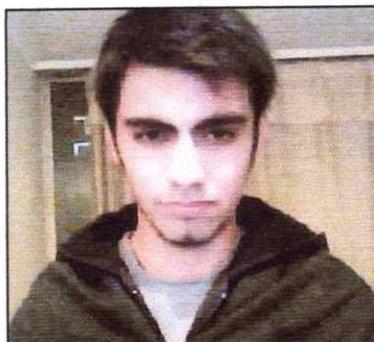
Presidente

Dra. Lee Meisel

Evaluadora

Santiago, enero de 2016

BIOGRAFIA



Nací en la comuna de Codegua, ubicada en la VI región del Libertador Bernardo O'Higgins, un 27 de julio hace algunos años atrás. Mi nombre es Ignacio. Los nombres son importantes porque dicen mucho sobre las personas. Durante el transcurso de mi vida me han llamado de muchas otras maneras, por supuesto. La mayoría eran nombres burdos, aunque muy pocos inmerecidos. Pero crecí siendo Ignacio. Mis primeros mentores fueron mis padres y mi hermano, quienes me enseñaron a amar los libros, las artes, la música y la naturaleza. Cursé mi educación básica en el Instituto Lautaro de Codegua. La primera etapa de mi educación media, en el colegio Ena Bellemans Montti, fue irrelevante. La segunda, en cambio, fue determinante en la definición de mi futuro académico y profesional. Gran parte de lo que soy se lo debo al tiempo que pasé bajo el alero del Liceo Oscar Castro Zúñiga de Rancagua. He trabajado en muchas cosas distintas. He pasado noches en vela leyendo historias de fantasía, y aparentemente me he mantenido cuerdo. He hablado con mi músico favorito. He amado a mujeres y he ilustrado pasajes de libros que han conmovido a sus autores. Quizá hayas oído hablar de mí.

DEDICATORIA

Este Seminario está dedicado a mis maestros:

A los de la vida;

Margarita Soto
Manuel Morales
Alejandro Díaz
Rosa Soto
Boris Baeza
Mariela Herrera
Valeria Sotomayor
Catalina López
Fernanda Gutiérrez
Nicole Espejo
Álvaro Rossel
Renato Sandoval
Ignacio Avalos
Erick Armingol
Nicolás Brizuela
Francisco Osorio
Marco Gaete
Francisca Hofmann
Lorena Díaz
Bianca Di Cosmo
Fabricio González
David Ortega
Daniela Meza

A los de la ciencia;

Pamela Garay
Marcela Ahumada
Marcela Osorio
Claudia García
Claudia Stange
Carlos Flores
Juan Camilo Moreno
Paulina Fuentes
Nilo Mejía

Finalmente, pero de ninguna manera menos importante, a Nallatt Ocarez,
Quien con mucha paciencia y disposición me ha enseñado a ser el
Profesional que soy. Eres la mejor maestra que alguien podría tener, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto FONDECYT 1120532

A todo el equipo del Laboratorio de Fisiología y Genómica de Postcosecha, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) CRI La Platina.

INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 Aspectos generales del desarrollo floral.	1
1.2 Familia MADS-box de factores transcripcionales.	4
1.3 Importancia económica de la Uva de mesa.....	7
1.4 <i>Vitis vinifera</i> AGAMOUS-like 11 como gen candidato para la caracterización molecular de la apirenia.	8
1.5 Estrategia desarrollada.....	10
1.6 Objetivos.....	11
1.6.1 Objetivo general.....	11
1.6.2 Objetivos específicos.....	11
2. MATERIALES Y METODOS.....	12
2.1 REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS.....	12
2.2 MATERIAL BIOLÓGICO, TRANSFORMACION Y MEDIOS DE CULTIVO	12
2.2.1 Transformación de bacterias.....	13
2.2.2 Germinación de semillas de <i>Solanum lycopersicum</i>	14
2.2.3 Transformación estable de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom. ...	15

2.3 METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	19
2.3.1 Obtención y adquisición de vectores.....	19
2.3.2 Purificación del DNA plasmidial de <i>Escherichia coli</i>	20
2.3.3 Cuantificación y determinación de la pureza de ácidos nucleicos.	20
2.3.4 Visualización de ácidos nucleicos y determinación de la integridad de RNA.....	21
2.3.5 Precipitación de ácidos nucleicos para purificación.....	22
2.3.6 Extracción de DNA total desde tejido vegetal.	23
2.3.7 Identificación de líneas transgénicas estables de <i>Solanum lycopersicum</i> cv Micro-Tom mediante PCR.	24
2.3.8 Extracción de RNA desde tejido vegetal.	25
2.3.9 Síntesis de cDNA para análisis de expresión.	26
2.3.10 Evaluación de la integridad del cDNA mediante RT-PCR.....	27
2.3.11 Cuantificación de la acumulación relativa de transcritos mediante RT-PCR cuantitativo	28
2.4 Partidores utilizados.	37
2.5 Caracterización fenotípica de flores y frutos en desarrollo de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom.	39
2.6 Análisis estadístico.	39

3. RESULTADOS	41
3.1 Transformación genética estable de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom	41
3.2 Caracterización molecular de líneas transgénicas estables.....	43
3.2.1 Caracterización molecular de las líneas T ₀ transformadas con la construcción pGWB2/35S/VviAGL11.....	43
3.2.2 Caracterización molecular de las líneas T ₁ transformadas con la construcción pGWB2/35S/VviAGL11.....	45
3.3 Caracterización fenotípica de líneas T ₀ y T ₁ que expresan VviAGL11 bajo control del promotor fuerte CaMV 35S.	48
3.3.1 Caracterización fenotípica de frutos maduros.....	53
3.3.2 Caracterización fenotípica de semillas	55
3.3.3 Análisis de expresión de <i>SlyAGL11</i> y <i>VviAGL11</i> durante el desarrollo floral mediante RT-PCR semi-cuantitativo.....	58
3.3.4 Análisis de expresión de <i>SlyAGL11</i> y <i>VviAGL11</i> durante el desarrollo floral mediante RT-qPCR.	61
3.3.5 Determinación del número de copias del gen <i>VviAGL11</i> insertadas en el genoma de las líneas transgénicas analizadas.	64
4. DISCUSION Y PROYECCIONES.....	70
4.1 Evaluación de los niveles de expresión de <i>SlyAGL11</i> y <i>VviAGL11</i> en	

distintas etapas del desarrollo floral.....	70
4.2 Evaluación fenotípica de órganos florales en líneas que expresan <i>VviAGL11</i> bajo control del promotor CaMV 35S	72
4.3 Evaluación fenotípica de semillas en las líneas que expresan <i>VviAGL11</i> bajo control del promotor CaMV 35S.....	77
4.4 Determinación del número de copias de <i>VviAGL11</i> insertadas en el genoma de las líneas transgénicas	78
5. CONCLUSIONES.....	82
6. BIBLIOGRAFIA.....	84

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de partidores utilizados.....	38
Tabla 2: Datos para la construcción de curva de determinación de número de copias	67
Tabla 3: Número de copias de gen marcador HPT en líneas transgénicas transformadas con 35S / VviAGL11.....	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo ABCDE de desarrollo floral.....	4
Figura 2: Esquema de transformación genética estable de <i>Solanum lycopersicum</i> cv Micro-Tom.....	18
Figura 3: Construcción utilizada para los análisis funcionales basados en transformación genética de <i>Solanum lycopersicum</i> cv Micro-Tom	19
Figura 4: Estados de desarrollo analizados en <i>Solanum lycopersicum</i> cv Micro-Tom.....	32
Figura 5: Desarrollo de líneas transgénicas estables de tomate obtenidas mediante organogénesis somática.....	42
Figura 6: Validación de transformación genética de líneas T ₀ transformadas con 35S/VviAGL11 mediante PCR.....	43
Figura 7: Análisis de expresión de VviAGL11 en hojas de líneas transgénicas T ₀	44

Figura 8: Validación de transformación genética de líneas T1 transformadas con 35S/VviAGL11 mediante PCR.....	46
Figura 9: Expresión de VviAGL11 en hojas de líneas T1.....	47
Figura 10: Caracterización fenotípica de la estructura de flores de las líneas transgénicas que expresan el gen VviAGL11 bajo control del promotor CaMV 35S.....	50
Figura 11: Tallos ectópicos generados en líneas que expresan el gen VviAGL11 bajo control del promotor fuerte CaMV 35S.....	51
Figura 12: Tamaño de frutos provenientes de líneas transgénicas que expresan VviAGL11 bajo control del promotor fuerte CaMV 35S.....	53
Figura 13: Efecto de la alteración en la estructura de los órganos florales sobre el desarrollo de las semillas y el fruto.....	54
Figura 14: Caracterización fenotípica de semillas.....	56
Figura 15: RT-PCR semi-cuantitativo en distintos estados del desarrollo floral de <i>Solanum lycopersicum</i>	59
Figura 16: Análisis de expresión relativa de VviAGL11 y SlyAGL11 en los estados 0 y 4.....	60
Figura 17: Expresión relativa de SlyAGL11 y VviAGL11 en el estado 0 de desarrollo floral.....	62
Figura 18: Expresión relativa de SlyAGL11 y VviAGL11 en el estado 4 de desarrollo floral.....	63
Figura 19: Construcción de curva estándar para determinación del número de copias.....	66

Figura 20: Efecto de la expresión ectópica de *VviAGL11* sobre la formación de cuartetos florales de factores transcripcionales MADS-box involucrados en el desarrollo floral.....77

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL11: *AGAMOUS - like 11*

ANOVA: análisis de varianza

bp : pares de bases

C- : control negativo

C+ : control positivo

CaMV : virus del mosaico de la coliflor

ccdB^R : gen de resistencia a la toxina ccdB de *Escherichia coli*

cDNA : DNA complementario

CDS : secuencia de DNA codificante

C_T : ciclo umbral

D.O. : Densidad Óptica

DNA : ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

dpa : días post-antesis

EDTA : ácido etilendiaminotetracético

FBP : Floral-binding protein de *Petunia hybrida*

gDNA : DNA genómico

HPT : Hygromycin Phosphotransferase, gen de resistencia a higromicina

LB : Lysogeny-Broth

MOPS : ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico

mRNA : RNA mensajero

NOS: nopalina sintasa

PCR : reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: PCR cuantitativo en tiempo real

RNA : ácido ribonucleico

RNAi : RNA interferente

RT : transcripción reversa

S.O.C. : Super Optimal broth with Catabolite repression, medio de cultivo de *E. coli*

SD : sin digerir

siRNA : RNA interferente pequeño

SlyAGL11 : gen AGAMOUS - like 11 de *Solanum lycopersicum*

STK : gen SEEDSTICK de *Arabidopsis thaliana*

TAE : amortiguador a base de Tris-básico, Acido acético y EDTA

Taq : *Thermus acuaticus*

Tm : temperatura de denaturación térmica

VviAGL11 : gen AGAMOUS - like 11 de *Vitis vinifera*

WT : Wild-type, organismo silvestre

RESUMEN

La uva de mesa es el cultivo exportado más importante en la industria frutícola nacional, abarcando un 17.58% de la producción en 2014. Su importancia económica lo convierte en un candidato prioritario para el estudio de atributos de calidad de interés agronómico tales como sabor, apirenia (ausencia total o parcial de semillas), tamaño, color, entre otros. Trabajos previos permitieron identificar y proponer a *Vitis vinifera* *AGAMOUS-Like 11* (*VviAGL11*) como el mejor gen candidato responsable del control genético de la apirenia en uva de mesa. *VviAGL11* es un factor transcripcional perteneciente a la familia de genes MADS-box MIKC^C de Clase D y, además de su rol en el desarrollo de óvulos y semillas, aparentemente afecta el tamaño de la baya, la firmeza y la fecha de cosecha. No existe claridad con respecto a si *VviAGL11* afecta estos rasgos de manera directa o a través del efecto pleiotrópico mediado por hormonas producidas en la semilla.

Con el propósito de caracterizar la funcionalidad del gen *VviAGL11*, se realizó la transformación genética estable de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, que permitió introducir *VviAGL11* en plantas de tomate silvestres. La expresión de *VviAGL11* en plantas de tomate silvestres bajo control del promotor fuerte *CaMV 35S* produjo alteraciones, sin cambio de identidad, en la morfología de las flores durante su desarrollo, tales como enroscamiento de pétalos, engrosamiento de sépalos, carpelos sobre-desarrollados, entre otras, sustentadas por el alto nivel de expresión de *VviAGL11* en estados tempranos del desarrollo floral, así como también alteraciones en la morfología de las semillas de algunas de las líneas analizadas y alteraciones de

tamaño y de forma, en comparación con la planta silvestre. Los análisis de expresión de *VviAGL11* en distintas etapas del desarrollo floral y los resultados de la caracterización fenotípica de semillas, permiten concluir que *VviAGL11* incide en el tamaño de las semillas, y además influye en el desarrollo de los órganos florales en las condiciones estudiadas, sugiriendo que *VviAGL11* posee un rol en los procesos de desarrollo floral.

ABSTRACT

Table grapevine is the most important exported crop within the national fruit industry, covering 17.58% of fruit production in 2014. Its economic importance makes it a priority candidate for the study of quality traits of agronomic interest such as flavor, seedlessness, size, color, among others. Previous work enabled us to identify and propose *Vitis vinifera* AGAMOUS-Like 11 (*VviAGL11*) as the best candidate gene responsible of the genetic control of seedlessness in grapevine. *VviAGL11* is a transcription factor that belongs to the MADS-box family of genes and, besides its role in seedlessness, it appears to affect berry size, firmness and harvest date; as well as flower organs, ovule and berry development. It is not clear if *VviAGL11* affects these traits directly or through the pleiotropic effect mediated by hormones produced by the seed.

With the purpose to further characterize the functionality of *VviAGL11*, we introduced *VviAGL11* in wild type tomatoes. Expression of *VviAGL11* in wild type tomato (cv Micro-Tom) plants under control of CaMV 35S promoter produced

alterations, without identity alteration, in flower morphology through its development, such as curled petals, thicker sepals, overdeveloped carpels, among others, supported by the high expression levels of *VviAGL11* in early stages of flower development, as well as alterations in seed morphology in some of the analyzed transgenic lines, such as size and shape alterations, compared to the wild-type plants. Both expression analyzes of *VviAGL11* in different stages of flower development and the phenotypic characterization of seeds allowed us to conclude that *VviAGL11* influences seed size, and flower organ development in the studied conditions, suggesting that *VviAGL11* has a role in the process of flower development.

1. INTRODUCCION

1.1 Aspectos generales del desarrollo floral.

La especificación de la identidad de los órganos florales está controlada por genes que actúan como interruptores de desarrollo que por un lado activan el programa apropiado para el desarrollo de un órgano en particular y por otro reprimen los programas no apropiados (Kaufmann y col., 2005). En este contexto, el modelo ABC de desarrollo floral (Coen y Meyerowitz, 1991) fue establecido como la base para el estudio del desarrollo de flores y frutos en angiospermas. El modelo ABC, concebido a partir de estudios en mutantes homeóticas de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en el desarrollo de sus órganos florales en comparación con las plantas silvestres, propone que los genes involucrados en el desarrollo actúan en secciones sobrelapadas que ocupan dos corolas florales adyacentes, definiendo la posición de las células en la flor en desarrollo. Los estudios en dichas mutantes dieron origen a la definición de las distintas clases de genes presentes en el modelo y sus funciones dentro de éste, siendo así A, por la función genética de *APETALLA2*; B, por la función genética de *APETALA 3* y *PISTILLATA*; y C, por la función genética de *AGAMOUS* (Bowman y col., 2012). Estos genes actúan como interruptores del desarrollo que controlan el programa genético completo requerido para el desarrollo de un órgano en particular. El modelo ABC establece que la identidad de los órganos florales en cada corola es determinada por una combinación única de la actividad de genes pertenecientes a las Clases A, B y C. Así, la expresión de genes de Clase A por sí sola especifica la formación de sépalos; la combinación de genes de Clase A y B determina el desarrollo de pétalos; la

combinación de genes de Clase B y C especifica la formación de estambres, y la expresión de genes de Clase C por sí sola determina el desarrollo de carpelos (Weigel y Meyerowitz, 1994). Sin embargo, el modelo ABC no presenta una explicación completa de los procesos de desarrollo, puesto que estudios posteriores revelaron que, si bien los genes de Clase A, B y C son necesarios para los procesos de desarrollo, no son suficientes para la determinación de la identidad de los órganos florales. Estudios de genética reversa en *Petunia hybrida*, donde la expresión ectópica de *Floral Binding Protein 11 (FBP11)* indujo el desarrollo de óvulos sobre sépalos y pétalos; y donde se realizó la co-supresión de *Floral Binding Protein 7 (FBP7)* y *FBP11*, revelaron la existencia de genes involucrados de manera específica en la determinación de la identidad del óvulo, añadiendo una nueva función al modelo ABC clásico (Función D), ampliando el conocimiento con respecto a la especificación de la identidad de los órganos florales (Angenent y Colombo, 1996). Finalmente, trabajos realizados en mutantes de *Arabidopsis thaliana*, llevaron al descubrimiento de una quinta clase de genes involucrados en el desarrollo, denominados genes de Clase E (Theissen y Saedler, 2001). Los genes de Clase E, definidos a partir de la función de genes *SEPALLATA* en *Arabidopsis thaliana*, son requeridos para el desarrollo de todas las categorías de órganos florales (Malcomber y Kellogg, 2005), dado que actúan como el "adhesivo molecular" que favorece la interacción entre los distintos factores transcripcionales en los procesos de desarrollo floral (Immink y col, 2009). De esta forma, el modelo ABC clásico ha sido ampliado con el transcurso del tiempo, conocido hoy como el modelo ABCDE de desarrollo floral (Figura 1). El mecanismo a través del cual los genes del modelo ABCDE ejercen su función en los procesos de desarrollo

propone que los distintos genes involucrados en la determinación de la identidad de un órgano en particular se unen al DNA formando complejos multiméricos de cuatro factores transcripcionales que finalmente gatillarán la activación o la inactivación del programa de desarrollo asociado al órgano en cuestión (Egea-Cortines y col., 1999; Honma y col., 2001), dando origen al modelo de los "cuartetos florales" de determinación de la identidad de los órganos florales, que propone que cuatro diferentes combinaciones de proteínas florales homeóticas determinan la identidad de los cuatro diferentes órganos florales (Theissen y Saedler, 2001). La caracterización molecular de los genes pertenecientes a las distintas clases de funciones que participan en el desarrollo floral, reveló que la gran mayoría de ellos pertenecen a la familia MADS-box de factores transcripcionales.

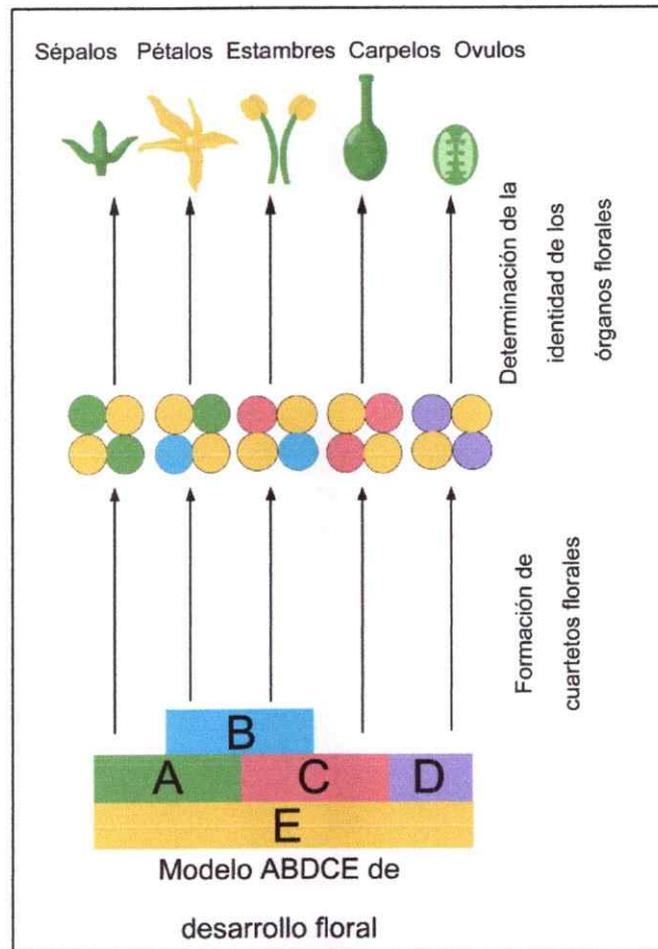


Figura 1: Modelo ABCDE de desarrollo floral. La interacción de las proteínas codificadas por los distintos genes de clases A, B, C, D y E activan o reprimen los programas de desarrollo de los distintos órganos florales. A+E, Sépalos. A+B+E, Pétalos. B+C+E, Estambres. C+E, Carpelos. D+E, Óvulos. El esquema del modelo fue adaptado de Guisheng y col. (2003)

1.2 Familia MADS-box de factores transcripcionales.

Los genes MADS-box, que codifican para la familia de factores transcripcionales de dominio MADS, están involucrados en todos los eventos mayores de la vida de las plantas terrestres (Gramzow y Theissen, 2010). Estos factores transcripcionales se

caracterizan por poseer un dominio de unión a DNA altamente conservado de 58 aminoácidos, denominado dominio MADS (Messenguy y Dubois, 2003). En plantas, los genes MADS-box pueden dividirse en dos grupos principales, siendo éstos los genes MADS-box de tipo I y de tipo II. Ambos grupos difieren en muchas de las características que los definen, como en el tamaño o el número de exones (Bemer y col., 2010; De Bodt y col., 2003), entre otras. Estas diferencias permitieron concluir que los genes MADS-box de tipo I son más variables que los de tipo II en las diferentes angiospermas (Gramzow y Theissen, 2010). La gran mayoría de los genes pertenecientes al modelo ABCDE de desarrollo floral pertenecen a la familia MADS-box de factores transcripcionales, en particular, de tipo II. Estos últimos se caracterizan por la presencia de un dominio similar a keratina (dominio K) y son comúnmente denominados factores transcripcionales MADS-box MIKC, según la estructura de sus dominios proteicos; I, "intervening"; K, similar a keratina; y C, dominio carboxi-terminal. Los factores transcripcionales MIKC, a su vez, pueden ser sub-clasificados en los grupos MIKC^C y MIKC^{*}, según el número de exones que codifican el dominio I y las diferencias estructurales en el dominio K (Henschel y col., 2002). De esta manera, la amplia mayoría de los genes MADS-box involucrados en los procesos de desarrollo floral pertenecen al grupo MIKC^C. Estos genes han sido ampliamente caracterizados en especies de plantas modelo, y tienen roles determinantes en el crecimiento y el ciclo reproductivo de las angiospermas (De Folter y col., 2006; Riechmann y Meyerowitz, 1997). A pesar de que se ha reportado que los distintos genes poseen funciones específicas, estudios en *Arabidopsis thaliana*, donde la supresión de la función de algunos miembros del grupo de genes de Clase E de tipo *SEPALLATA* produce

alteraciones ligeras en el fenotipo, muestran que existe redundancia genética en la función de los genes, particularmente entre miembros del mismo clado filogenético (Pinyopich y col., 2003; Ditta y col., 2004). La actividad de los factores transcripcionales de dominio MADS requiere de la formación de homo y heterodímeros que reconocen una secuencia nucleotídica conservada entre las diferentes especies, conocida como la caja CARG. Luego, los dímeros formados interactúan entre sí formando los cuartetos florales propuestos por Theissen y Saedler (2001), que activan o reprimen los programas de desarrollo específicos para la determinación de los distintos órganos florales.

La importancia que poseen los genes MADS-box MIKC^C en el desarrollo de flores y frutos en las plantas terrestres los convierte en potenciales candidatos de estudio para la mejora de características de interés agronómico (Seymour y col., 2008). A modo de ejemplo, trabajos realizados en manzana (*Malus domestica*) muestran que es posible producir frutos apirénicos (sin semillas) mediante mutaciones en el gen *MdPI* (*PISTILLATA*), perteneciente a la familia MADS-box (Yao y col., 2000). Mientras que en arroz (*Oryza sativa*) muestran que es posible producir plantas de menor altura y floración temprana a través de la expresión ectópica de *OsMADS1* bajo control del promotor nos (Jeon y col., 2000). En algodón (*Gossypium hirsutum* L cv Coker), la expresión ectópica de *PTM3*, perteneciente a la familia MADS-box, produjo plantas con floración temprana y con aumento de un 27% de la productividad (Ramachandran y col., 2011). Estos antecedentes muestran que el estudio de genes MADS-box puede ser de utilidad en los programas de mejoramiento de especies cultivables de interés

agronómico para la industria agronómica nacional.

1.3 Importancia económica de la Uva de mesa

La uva de mesa es el cultivo exportado más importante en la industria frutícola nacional, abarcando un 17,58% de la producción en 2014 (<http://www.odepa.cl>). Su importancia económica convierte a la uva de mesa en un candidato prioritario para el estudio de los atributos de calidad tales como sabor, color, tamaño, apirenia, firmeza, entre otras, siendo la incorporación de éstos el principal desafío para los programas de mejoramiento genético. En particular, uno de los atributos de calidad preferidos por los consumidores de uva de mesa es la apirenia, definida como la ausencia total o parcial de semillas, producida ya sea por partenocarpia (apirenia causada como consecuencia de una ausencia total de fertilización) o por estenoespermiocarpia (apirenia causada por el aborto de la cubierta seminal y el endospermo, después de ocurrida la polinización y fertilización). Sin embargo, si bien la apirenia es deseable, afecta negativamente otros atributos de calidad como el tamaño de las bayas, (Cabezas y col., 2006; Doligez y col., 2002; Mejía y col., 2007), posiblemente debido al efecto que poseen las semillas como promotoras endógenas del crecimiento (Coombe, 1960; May, 2000). Además, la aplicación exógena de ácido giberélico en variedades apirénicas de uva de mesa, produce un aumento en el tamaño de la baya (Casanova y col., 2009; Abu-Zahra. 2010), sugiriendo que existe una relación entre la semilla y el aporte hormonal que éstas producen con el crecimiento de la baya (Göktürk y Harmankaya, 2005). Sin embargo, no existe claridad sobre los mecanismos que controlan esta relación, puesto que se ha reportado que variedades apirénicas de uva de mesa

poseen niveles de acumulación endógena de giberelinas similar al de variedades semilladas (Iwahori y col., 1968; Pérez y col., 2000). Además de afectar el tamaño de la baya, la ausencia de semillas podría afectar otros atributos de calidad como la fecha de cosecha o la textura, por lo que se requiere una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a éstos fenómenos.

1.4 *Vitis vinifera* AGAMOUS-like 11 como gen candidato para la caracterización molecular de la apirenia.

Vitis vinifera AGAMOUS-like 11 (*VviAGL11*) es un gen de Clase D perteneciente a la familia MADS-box MIKC^C de factores transcripcionales homólogo a *SEEDSTICK* de *Arabidopsis thaliana* (Costantini y col., 2008; Doligez y col., 2013; Doligez y col., 2002; Mejía y col., 2011). Trabajos de caracterización genética, molecular y transcripcional en *Vitis vinifera* permitieron identificar y proponer a *VviAGL11* como el mejor gen candidato responsable del control genético de la apirenia en uva de mesa (Mejía y col., 2011). De acuerdo a estos estudios, *VviAGL11* se expresa en carpelos maduros, en semillas en desarrollo y frutos en pre y post envero; esta expresión, además de su clasificación dentro del grupo de genes de Clase D, sugieren que existe un rol para este gen en el desarrollo de óvulos, bayas y semillas en uva (Boss y col., 2002). La caracterización genética de *VviAGL11* propone la existencia de alelos "semillados", es decir, que otorgan el potencial de desarrollar semillas, y alelos "apirénicos", que generan frutos con ausencia total o parcial de semillas. En uva de mesa, se ha reportado que existe un pico de expresión de *VviAGL11* inmediatamente después de cuaja en variedades semilladas. En contraposición, variedades

homocigotas para el alelo apirénico de *VviAGL11* poseen niveles de expresión reducidos y desarrollan rudimentos de semilla, además de bayas más pequeñas (Mejía y col., 2011). No existe claridad con respecto a si *VviAGL11* afecta estos rasgos de manera directa o a través del efecto pleiotrópico mediado por hormonas producidas en la semilla.

Experimentos realizados en *Solanum lycopersicum* (cv. Micro-Tom) en los que la expresión del gen endógeno *SlyAGL11* [Solyc11g028020.1.1], homólogo a *VviAGL11*, fue silenciada, dieron como resultado frutos apirénicos, con pocas o ninguna semilla, validando el rol esencial de *SlyAGL11* en la determinación genética del fenotipo sin semillas: *SlyAGL11* es necesario para el desarrollo normal de semillas. Ninguna de las líneas obtenidas de estos experimentos mostró transformación de los órganos florales, sugiriendo que la identidad de estos no se ve alterada por la supresión de *SlyAGL11* (Ocaez y Mejía, 2015).

Por otro lado, la caracterización de mutantes *stk* de *Arabidopsis thaliana* reveló que existen alteraciones en el desarrollo de las silicuas y dificultad en el desprendimiento de las semillas desde el fruto maduro, pero no se reportan alteraciones relevantes en la morfología de las flores o en el desarrollo de semillas (Pinyopich y col., 2003).

Los antecedentes presentados, basados en sistemas modelo como *Arabidopsis thaliana* y tomate, sugieren que *AGL11* podría poseer múltiples roles, asociados al desarrollo de óvulos, semillas, carpelos, entre otros, sin embargo, la validación de estos roles, en particular la participación de *VviAGL11* en estos procesos

permanece incierta, por lo que es necesario realizar experimentos de validación funcional en sistemas heterólogos que permitan definir si *VviAGL11* posee una función específica en el desarrollo de semillas en frutos carnosos.

1.5 Estrategia desarrollada

En el grupo de trabajo se ha abordado la caracterización funcional del gen *VviAGL11* de *Vitis vinifera* mediante experimentos de ganancia y pérdida de función en sistemas heterólogos de corto período generacional. En este seminario de título, además de validar la funcionalidad, se buscó identificar si la ganancia del gen *VviAGL11* es suficiente para gatillar el desarrollo de óvulos y semillas (o alteraciones en el desarrollo de éstas); o alteraciones en la determinación de la identidad de los órganos florales, en concordancia con los resultados obtenidos en *Arabidopsis thaliana* y *Petunia x Hybrida* (Favaro y col. 2003, Colombo y col. 1995), a través de su expresión ectópica en plantas de tomate silvestres bajo control del promotor constitutivo y fuerte CaMV 35S derivado del virus del mosaico de la coliflor. El modelo utilizado para la transformación genética, *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, fue escogido en función de sus características y la utilidad de éstas para el estudio del gen en cuestión, ya que además de poseer un corto período generacional (Martí y col., 2006), permite la evaluación de los efectos del gen de interés a nivel de un fruto de características similares a la uva, puesto que ambos son frutos carnosos, derivan de un ovario súpero, poseen un epicarpio delgado, un mesocarpio y un endocarpio carnosos, entre otras (Coombe, 1976). La transformación de las plantas de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom fue realizada de acuerdo a la metodología descrita por

Sun y col. (2006), que consiste en la transformación de cotiledones provenientes de semillas germinadas de tomate, en co-cultivo con cepas de *Agrobacterium tumefaciens* portadoras de las construcciones de interés.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Caracterizar la función del gen *VviAGL11* de *Vitis vinifera* en el desarrollo de flores, frutos y semillas, utilizando como modelo a *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom.

1.6.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la función de *VviAGL11* en plantas de *Solanum lycopersicum* transformadas con la construcción pGWB2/35S/*VviAGL11*, que permite la expresión del gen *VviAGL11* de vid bajo control del promotor fuerte CaMV 35S.
- Caracterizar molecularmente las líneas transgénicas generadas.
- Caracterizar fenotípicamente las líneas transgénicas obtenidas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS

Los reactivos utilizados para el desarrollo de los experimentos fueron reactivos de biología molecular adquiridos en Merck, Invitrogen (Life Technologies), Promega, Axygen, Applied Biosystems, Sigma Aldrich, Phyto Technology Laboratories, Stratagene y Omega Bio-Tek.

Los equipos utilizados para la realización del trabajo experimental fueron, entre otros: Un autoclave vertical para la esterilización de soluciones y material según fuese requerido, una centrifuga refrigerada (FRESCO 21, Thermo Scientific), un espectrofotómetro Picodrop™ (PICOPET01), un termociclador convencional Veriti™ (Applied Biosystems) y un termociclador acoplado a un sistema óptico de detección StepOne Plus™ (Applied Biosystems).

2.2 MATERIAL BIOLÓGICO, TRANSFORMACION Y MEDIOS DE CULTIVO

Los microorganismos utilizados durante el desarrollo de éste trabajo corresponden a las cepas de *Escherichia coli* DH5 α OneShot® Mach1™ (genotipo: *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80/*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*), y *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Genotipo: C58, plásmido Ti curado, Gen^R, Rif^R). El material vegetal utilizado corresponde a explantes y semillas de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom.

2.2.1 Transformación de bacterias

El cultivo de bacterias fue realizado en medio LB-líquido (NaCl 1 % p/v, triptona 1 % p/v, extracto de levadura 0,5 % p/v) y LB-agar (NaCl 1 % p/v, triptona 1 % p/v, extracto de levadura 0,5 % p/v, agar-agar 1,4 % p/v), a 28 °C para *Agrobacterium tumefaciens* y a 37 °C para *Escherichia coli*.

La transformación de *Escherichia coli* fue realizada empleando el método de transformación por *shock* térmico. Primeramente, 2 – 5 µL del plasmidio o producto de ligación de interés fueron incubados con 50 µL de células de *Escherichia coli* competentes durante 30 min en hielo. Posteriormente, las células fueron sometidas a un *shock* térmico a 42 °C en un baño termo regulado durante 1 min, tiempo tras el cual las células fueron nuevamente incubadas en hielo durante 1 min. Para recuperar las células, se añadieron 250 µL de medio S.O.C estéril (triptona 2 % p/v, extracto de levadura 0,5 % p/v, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) bajo campana de flujo y seguidamente las células fueron incubadas a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 1 hora y 30 min. Finalmente, 100 y 200 µL del cultivo en medio S.O.C fueron sembrados en placas con LB-agar incubados durante 16 horas a 37 °C.

La transformación de *Agrobacterium tumefaciens* fue realizada empleando el método de transformación por *shock* térmico. Una alícuota de 50 µL de células de *Agrobacterium tumefaciens* quimiocompetentes fue incubada en hielo durante 20 min con 1.000 ng del plasmidio de interés. Posteriormente, las células fueron sometidas a un *shock* térmico con nitrógeno líquido durante 5 min, tiempo tras el cual las células



fueron descongeladas por 15 min a temperatura ambiente. Luego, las células se recuperaron con 1 mL de medio LB-líquido agregado bajo campana de flujo laminar y seguidamente las células fueron incubadas a 28 °C en agitación durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, 100 µL y 950 µL (concentrados a 100 µl por centrifugación a 2.000 rpm por 5 min y descarte del sobrenadante) de cultivo en medio LB-líquido fueron sembrados en placas con medio LB-agar suplementado con rifampicina (10 mg/L) y gentamicina (50 mg/L) para la selección de *Agrobacterium tumefaciens* y el antibiótico correspondiente para la selección de las bacterias transformadas (kanamicina 100 mg/L) y fueron incubadas en oscuridad durante 48 horas a 28 °C.

2.2.2 Germinación de semillas de *Solanum lycopersicum*.

La germinación de semillas para la obtención de explantes y la propagación sexual de plantas transformadas fue realizada *in vitro*. En primera instancia, las semillas a germinar fueron hidratadas en agua durante 24 h, para luego ser desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio 30% v/v y Tween 20 0,1% v/v durante 20 min. Luego, se realizaron tres lavados con H₂O destilada estéril. Posteriormente, las semillas desinfectadas fueron secadas en papel filtro estéril y sembradas en placas Petri con medio de germinación (MS (Murashige & Skoog basal medium, *PhytoTechnology Laboratories*™) 0,44 % p/v, sacarosa 2,5 % p/v, MES 0,05 % p/v, agar-agar 0,8 % p/v, pH = 5,7). Una vez sembradas, las semillas fueron incubadas en oscuridad durante 2 semanas en una cámara de crecimiento a 25 °C. Para la generación de plantas T₁ provenientes de semillas de líneas transgénicas (T₀)

de *Solanum lycopersicum*, el medio de germinación fue suplementado con higromicina 10 mg/L.

2.2.3 Transformación estable de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom.

Los explantes de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom a transformar fueron obtenidos a partir de cotiledones provenientes de semillas desinfectadas y germinadas *in vitro*. La transformación de explantes de *Solanum lycopersicum* mediante *Agrobacterium tumefaciens* fue realizada en medio MS-líquido (MS [Murashige & Skoog basal medium, *PhytoTechnology Laboratories*™] 0,44 % p/v, sacarosa 3 % p/v, pH = 5,8) suplementado con acetosiringona 0,2 mM. Para la organogénesis somática y regeneración *in vitro* de *Solanum lycopersicum* transformado se utilizó el medio MS-agar (MS (Murashige & Skoog basal medium, *PhytoTechnology Laboratories*™) 0,44 % p/v, sacarosa 3 % p/v, agar-agar 0,8 % p/v, pH = 5,8).

La transformación, organogénesis somática y regeneración *in vitro* de *Solanum lycopersicum* fue realizada de acuerdo al protocolo descrito por Sun y col. (2006) con ligeras modificaciones (Figura 2). Los clones de *Agrobacterium tumefaciens* transformados con las construcciones de interés fueron cultivados en medio LB-líquido suplementado con antibióticos (rifampicina 10 mg/L, gentamicina 50 mg/L y kanamicina 100 mg/L) durante 48 horas a 28 °C, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0,6 – 0,8. Transcurrido este tiempo, el cultivo fue centrifugado a 5.000 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 1 mL de medio MS líquido suplementado con acetosiringona 0,2 mM. Posteriormente, se incubó en

agitación por aproximadamente 2 h a 28 °C. Luego, se midió nuevamente su D.O.₆₀₀, y cada cultivo fue diluido hasta una D.O.₆₀₀ de 0,06. Luego, los cotiledones obtenidos a partir de la germinación de semillas fueron seccionados cortando sus extremos y co-cultivados durante 20 min con *Agrobacterium tumefaciens* transformado con la construcción de interés. Transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de cultivo de los cotiledones en papel filtro estéril y posteriormente fueron depositados en placas Petri con medio MS-agar suplementado con la citoquinina zeatina 2 mg/L durante 2 días a 25 °C. Posteriormente, los cotiledones transformados fueron depositados en placas Petri con medio MS-agar suplementado con zeatina 2 mg/L para la inducción de callos y brotes, timentina 800 mg/L para la eliminación de *Agrobacterium* remanente en los explantes e higromicina 5 mg/L utilizada como antibiótico de selección de transformación. Habiéndose generado brotes sobre los cotiledones transformados, éstos fueron depositados en frascos de vidrio con medio MS-agar suplementado zeatina 1 mg/L para favorecer la elongación de tallos, timentina 500 mg/L e higromicina 5 mg/L. Finalmente, las plántulas regeneradas fueron depositadas en frascos de vidrio con medio MS-agar suplementado con timentina 500 mg/L e higromicina 5 mg/L, eliminándose el aporte de zeatina y cambiando la composición del medio MS-agar para favorecer la generación de raíces (MS (Murashige & Skoog basal medium, PhytoTechnology Laboratories TM) 0,21 % p/v, sacarosa 1,5 % p/v, Phytigel[®] 0,32 % p/v, pH = 5,8). Los cambios de medio se realizaron cada dos semanas para mantener cada componente fresco, especialmente la hormona zeatina y los antibióticos timentina e higromicina. En cada una de las etapas de organogénesis se mantuvieron los explantes aproximadamente dos meses, de esta forma el proceso completo hasta la

generación de plántulas se llevó a cabo en unos seis meses.

Una vez que las plántulas (T_0) de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom fueron regeneradas y presentaron raíces *in vitro*, o germinaron en el caso de las líneas T_1 (aproximadamente 1 mes) estas fueron trasplantadas a vasos plásticos con una mezcla de turba: vermiculita: perlita en proporción 2:1:1 y cubiertas con otro vaso plástico transparente invertido para ser aclimatadas en una cámara de crecimiento experimental a 23 °C con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Semanalmente se realizaron orificios en el vaso plástico de cubierta, para aclimatar las plantas a las condiciones de la cámara de cultivo. Al cabo de un mes las plantas ya se encontraban aclimatadas y se traspararon a macetas de 11 cm de alto x 12 cm de diámetro con el mismo sustrato.

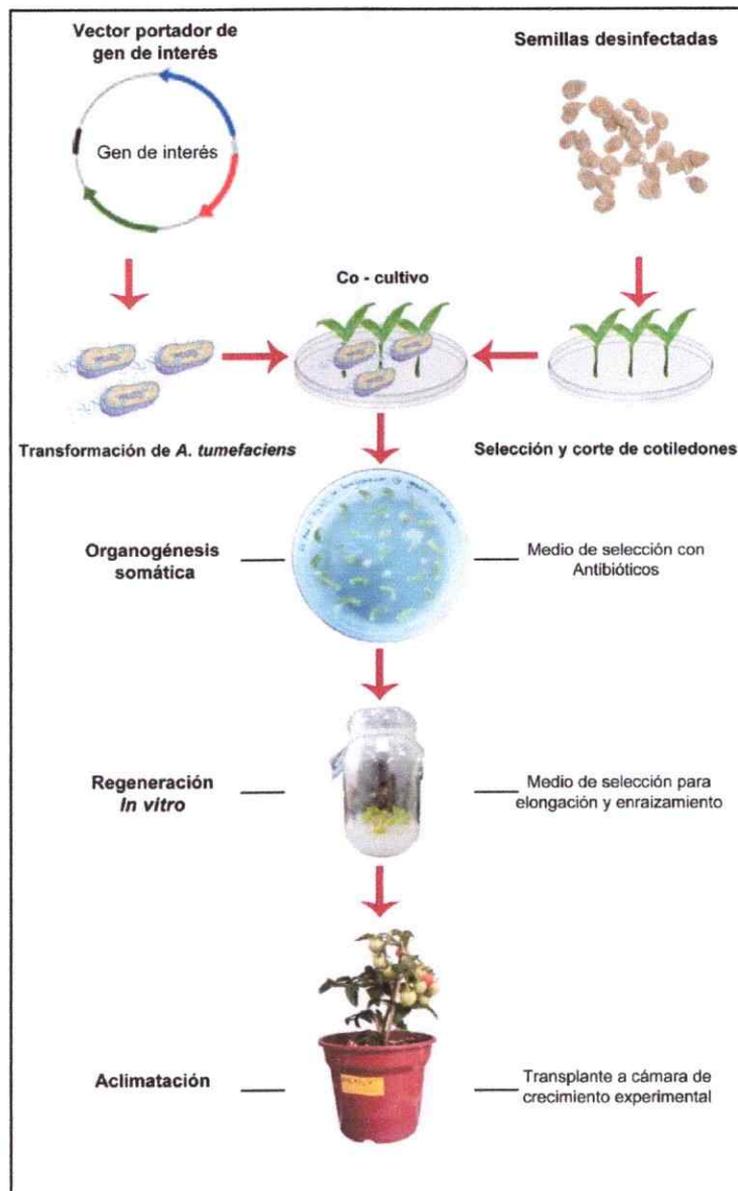


Figura 2: Esquema de transformación genética estable de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom. Cotiledones obtenidos a partir de semillas desinfectadas y germinadas *in vitro* fueron co-cultivadas con cepas de *Agrobacterium tumefaciens* portadoras de la construcción de interés. Los explantes transformados son cultivados en medio de selección suplementado con hormonas para favorecer la generación de brotes, su elongación y su posterior enraizamiento. Finalmente, las plántulas son aclimatadas a una cámara de crecimiento experimental, de acuerdo al protocolo descrito por Sun y col. en 2006

2.3 METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

2.3.1 Obtención y adquisición de vectores.

El vector utilizado para el desarrollo del trabajo experimental, pGWB2/35S/VviAGL11 (Figura 3), fue generado a partir del vector tipo Gateway® pGWB2 (Nakagawa y col., 2007) y validado por secuenciación por otros miembros del laboratorio, encontrándose disponible para su uso en el desarrollo de este trabajo.

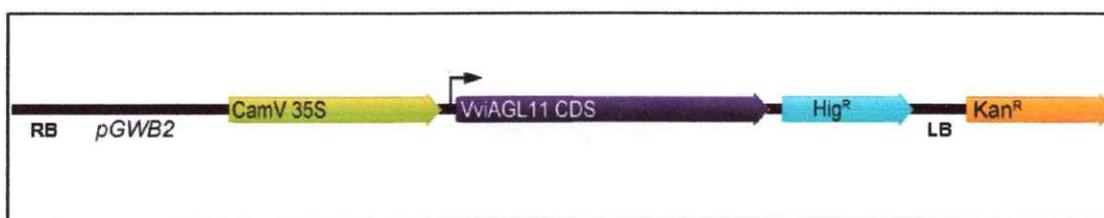


Figura 3: Construcción utilizada para los análisis funcionales basados en transformación genética de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom. Vector de expresión de tipo Gateway® que dirige la expresión de *VviAGL11* bajo control del promotor fuerte CaMV35 S, con resistencia a higromicina para selección en plantas y a kanamicina para selección en bacterias.

El vector pGWB2/35S/VviAGL11 fue clonado en *Escherichia coli* (Sección 2.2.1), purificado a partir de cultivos de ésta (Sección 2.3.2) y utilizado nuevamente para transformar cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (Sección 2.2.1), que posteriormente fueron utilizadas para la transformación de explantes de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom.

2.3.2 Purificación del DNA plasmidial de *Escherichia coli*.

La purificación de DNA plasmidial a partir de cultivos de *Escherichia coli* fue realizada utilizando el kit comercial Wizard[®] Plus SV de Promega, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El DNA purificados fue verificado mediante análisis de restricción. El plasmidio, una vez verificado, fue utilizado para los procesos de transformación genética de *Agrobacterium tumefaciens*, y como templado en amplificaciones intermedias o controles.

2.3.3 Cuantificación y determinación de la pureza de ácidos nucleicos.

La cuantificación de los ácidos nucleicos fue realizada por fluorimetría utilizando un fluorímetro Qubit[®] 2.0 (Invitrogen (Life Technologies)). La pureza de los ácidos nucleicos fue determinada por espectrofotometría midiendo la absorbancia de los ácidos nucleicos a $\lambda = 260$ nm, utilizando un espectrofotómetro Picodrop[®] PICOPET01. Además, el software del equipo entrega las razones de absorbancia 260/280 y 260/230, utilizadas para evaluar la pureza tanto del DNA como del RNA. Una razón 260/280 de aproximadamente 1,8 es un indicador de la pureza del DNA, mientras que una razón de aproximadamente 2,0 es un indicador de pureza para el RNA, indicando la ausencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorban a $\lambda = 280$ nm. Por su parte, una razón 260/230 en un rango de 2,0 – 2,2 es generalmente aceptada como indicador de pureza tanto para DNA como para RNA.

2.3.4 Visualización de ácidos nucleicos y determinación de la integridad de RNA

La visualización de los ácidos nucleicos fue realizada mediante electroforesis en gel de agarosa. Para la visualización de DNA, los geles fueron preparados en un rango de concentración de agarosa de 0,8 – 2 % p/v según el tamaño de los fragmentos a analizar, con amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y bromuro de etidio 1 µg/mL. A cada muestra de entre 5 - 8 µL se añadieron 2 µL de amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y sacarosa 6%). En la mayoría de los productos de PCR, en cuya reacción se añadió Rojo Cresol 0,1 mM disuelto en Sacarosa 12%, no fue necesaria la adición de Amortiguador de carga. La corrida electroforética fue realizada en cámaras que contenían amortiguador TAE 1X con una diferencia de potencial de entre 80 – 110 V durante 30 – 40 min.

Para corroborar la integridad del RNA, las muestras experimentales fueron visualizadas en geles preparados a una concentración de agarosa de 1,5 % p/v, formaldehído 3% y amortiguador MOPS 1X (MOPS 400 mM, CH₃COONa 100 mM y EDTA 10 mM pH 8). A 1 µg de cada muestra de RNA se añadió 1 µL de amortiguador de carga denaturante (Formamida 100%, Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y bromuro de etidio 0,1 µg/µL). La mezcla fue denaturada por 10 min a 70 °C y rápidamente incubada en hielo por 5 min. La corrida electroforética fue realizada en cámaras con amortiguador MOPS 1X a una diferencia de potencial de 80 V durante 40 min. Para determinar la integridad del RNA total, se verificó la presencia de las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S en una razón 2:1.

En ambos casos, los geles fueron observados bajo luz UV en un transiluminador Bio-Rad® Power Hood II y fotografiados con una cámara fotográfica Canon® Power Shot A640 del sistema DigiDoc de AlphaPro Viewer®.

2.3.5 Precipitación de ácidos nucleicos para purificación.

Con el fin de purificar tanto productos de reacciones de PCR como muestras experimentales provenientes de extracciones de DNA y RNA totales según fuese necesario, los ácidos nucleicos fueron precipitados con acetato de amonio($\text{CH}_3\text{COONH}_4$). La precipitación del DNA fue realizada de manera que un volumen de muestra de DNA fue mezclado por inversión con un volumen de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 7,5 M y dos volúmenes de etanol absoluto. La mezcla fue incubada a -20 °C durante 1 hora y posteriormente centrifugada durante 30 min a 16.000 x g. Luego, el sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue lavado con etanol 80% v/v. Finalmente, tras una centrifugación a 16.000 x g durante 15 min, el sobrenadante fue descartado y las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente para eliminar trazas de etanol. El *pellet* fue resuspendido en H_2O libre de nucleasas (Invitrogen, Life Technologies). La precipitación del RNA fue realizada de forma que 1 volumen de muestra de RNA fue mezclado con 0,1 volúmenes de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 2,5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla fue incubada a -20 °C durante 25 min y posteriormente centrifugada a 17.000 x g durante 15 min a 4 °C. Luego, el sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue lavado con etanol 80 % v/v. Finalmente, tras una centrifugación a 16000 x g durante 3 min, el sobrenadante fue descartado y las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente para eliminar trazas de etanol. El *pellet* fue resuspendido en H_2O libre de

nucleasas (Invitrogen, Life Technologies).

2.3.6 Extracción de DNA total desde tejido vegetal.

La extracción de DNA total desde hojas de *Solanum lycopersicum* fue realizada de acuerdo al protocolo adaptado de Lodhi (1994), donde aproximadamente 1 cm² de tejido fue homogenizado con 700 µL de amortiguador de extracción (EDTA 20 mM, tris-HCl 100 mM NaCl 1,4 M CTAB 2 % p/v, β-mercapto- etanol 0,2% v/v, pH = 8) en un homogeneizador de tejido Precellys[®] 24 (Bertin Technologies) durante 15 s a 6.600 rpm. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en un baño termo-regulado a 60 °C durante 25 min, mezclando por inversión cada 5 min. Luego, las muestras fueron enfriadas en hielo y mezcladas por inversión durante 3 min con 700 µL de Cloroformo:Alcohol Isoamílico en proporción 24:1. En seguida, las muestras fueron centrifugadas durante 15 min a 10.000 rpm, y aproximadamente 470 µL del sobrenadante fueron rescatados y trasvasiados a tubos de microcentrifuga de 1,5 mL con 200 µL de NaCl 5M. Posteriormente, las muestras fueron mezcladas con 900 µL de etanol absoluto a 4 °C y mezcladas por inversión. Las muestras fueron incubadas a -20 °C durante 40 min, para luego ser centrifugadas a 3.000 rpm durante 3 min y sucesivamente re-centrifugadas a 6.000 rpm durante 3 min. Seguidamente, el sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue lavado con etanol 80 % p/v. Finalmente, tras una centrifugación a 11.000 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue descartado y las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente para eliminar trazas de etanol. El *pellet* fue posteriormente resuspendido en H₂O libre de nucleasas (Invitrogen, Life

Technologies) e incubado durante 30 min a 37 °C con 1 U de RNAsa A.

2.3.7 Identificación de líneas transgénicas estables de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom mediante PCR.

Para comprobar la integración de las construcciones de interés en las plantas T₀, y la herencia de las mismas en las líneas T₁ de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, se extrajo DNA genómico a partir de hojas utilizando el protocolo descrito en la sección 2.3.10, que posteriormente fue cuantificado y visualizado según fue descrito anteriormente (sección 2.3.4). Luego, cada muestra fue diluida a 25 ng/μL. Cada reacción de PCR de 20 μL se compuso de 7,4 μL de H₂O libre de nucleasas (Invitrogen, Life Technologies), 0,6 μL de MgCl₂ 50 mM (Sigma - Aldrich), 2 μL de amortiguador Taq DNA polimerasa 10X (Tris HCl 100 mM y KCl 500 mM a pH 8.8), 0,5 μL de cada par de primers a 10 μM, 0,8 μL de dNTPs 10 mM (Invitrogen (Life Technologies)), 4 μL de Rojo Cresol 0,1 mM disuelto en sacarosa 12% y 0,2 μL (1 U) de Taq DNA Polimerasa (Purificada en el laboratorio a partir de *Escherichia coli* recombinante, según el protocolo de Pluthero (1993)). Como templado, en cada reacción se añadieron 4 μL de la dilución inicial de cada muestra de DNA. Para confirmar la incorporación de los transgenes en el genoma de las líneas que crecieron con presión selectiva se utilizaron diversas combinaciones de primers. Para la construcción pGWB2/35S/VviAGL11 se realizaron tres reacciones de PCR independientes utilizando las siguientes combinaciones de primers: *SlyCAC03 F* – *SlyCAC03 R*, que amplifica un fragmento de 378 bp del gen de referencia CAC (Clathrin adaptor complexes medium subunit) de *Solanum lycopersicum* [Solyc08g006960] (Expósito-Rodríguez y col., 2008), para

verificar la integridad del DNA extraído; *VviAGL11_8F* - *VviAGL11_8R*, que amplifica un fragmento de 700 bp del gen *VviAGL11* de *Vitis vinifera*, y *35Su F* - *35Su R*, que amplifica un fragmento de 270 bp del promotor fuerte CaMV 35S (Tabla 1). En cada caso se añadió además un control sin templado y un control positivo, que para la reacción de validación de la integridad fue DNA genómico de *Solanum lycopersicum* previamente verificado en el laboratorio, y en las dos reacciones siguientes fue el vector pGWB2/35S/*VviAGL11*. 10 μ L del producto de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa de acuerdo a la metodología descrita en la sección 2.3.7.

2.3.8 Extracción de RNA desde tejido vegetal.

Para la extracción de RNA desde hojas, flores en desarrollo y frutos en desarrollo de plantas de *Solanum Lycopersicum* cv. Micro-tom transformadas con la construcción pGWB2/35S/*VviAGL11*, se utilizó el reactivo RNA-solv[®] de Omega Bio-tek. Unos 100 mg de tejido fueron molidos en un mortero estéril con nitrógeno líquido y homogenizados con 1 mL de RNA-solv[®]. El producto homogenizado fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL donde se agregaron 200 μ L de cloroformo, se agitó en un vórtex durante 30 s y se incubó en hielo durante 10 min. Seguidamente, se centrifugó a 12.000 x g por 15 min a 4°C, rescatándose aproximadamente el 80% de la fase acuosa, que fue transferida a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Enseguida, el RNA fue precipitado agregando 500 μ L de isopropanol a 4°C, se mezcló suavemente por inversión 10 veces y se incubó por 20 min a -20°C. Posteriormente, se centrifugó por 10 min a 12.000 x g a 4 °C y se descartó completamente el

sobrenadante. El *pellet* fue lavado con 500 μ L de etanol 80% v/v en agua libre de nucleasas (Invitrogen, Life Technologies), centrifugado por 3 min a 16.000 x g a 4°C, secado y resuspendido en H₂O libre de nucleasas (Invitrogen, Life Technologies). 1 μ g de RNA extraído fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa para la evaluación de su integridad después de ser evaluados mediante espectrofotometría y fluorimetría como se describió en la sección 2.3.3.

2.3.9 Síntesis de cDNA para análisis de expresión.

1,4 μ g de RNA total extraído (de hojas, flores o frutos en desarrollo) desde líneas transgénicas T₀ y T₁ transformadas con la construcción pGWB2/35S/VviAGL11 fueron tratados con DNAsa I para eliminar trazas de DNA genómico. La reacción de un volumen total de 30 μ L contuvo 1 μ L de DNAsa I (1 U, Thermo Scientific), 0,25 μ L de inhibidor de RNAsa RiboLock™ (10 U, Thermo Scientific), 3 μ L de amortiguador de DNAsa I 10X (Thermo Scientific) y H₂O libre de nucleasas (Invitrogen, Life Technologies) según sea necesario. La reacción fue incubada durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, la enzima fue inactivada añadiendo a cada reacción 1 μ L de EDTA 25 mM. El RNA así tratado con DNAsa I fue utilizado para la síntesis de cDNA.

Las reacciones de transcripción reversa fueron realizadas en dos etapas; en la primera, 1 μ g de RNA tratado (22,5 μ L) fue mezclado con 2 μ L de dNTPs 10 mM (Invitrogen, Life Technologies) y 2 μ L del partidor oligo dT 10 mM. Luego, la mezcla fue incubada a 60 °C durante 5 min y sucesivamente incubada en hielo durante 5 min. En

la segunda etapa, se añadieron 8 μL de amortiguador de transcriptasa reversa RT M-MLV 5X (Invitrogen, Life Technologies), 4 μL de DTT 1 mM, 0,5 μL de inhibidor de RNasa RiboLock™ (20 U), y 1 μL de transcriptasa reversa RT M-MLV (200 U, Invitrogen, Life technologies), resultando en un volumen final de 40 μL . La reacción final fue incubada a 37 °C durante 50 min., y posteriormente inactivada a 70 °C durante 15 min.

2.3.10 Evaluación de la integridad del cDNA mediante RT-PCR.

La integridad del cDNA proveniente de plantas T_0 y T_1 que expresan la construcción pGWB2/35S/VviAGL11 fue evaluada mediante la amplificación por RT-PCR de un fragmento de 100 bp del gen de referencia *TCPB* (T-complex protein 1 subunit beta-like) de *Solanum lycopersicum*, que permite diferenciar por tamaño de amplificado entre DNA genómico y cDNA. En cada reacción se añadió un control sin templado, además de un control positivo que en este caso corresponde a DNA genómico de *Solanum lycopersicum*. Cada reacción de 20 μL contuvo 10,4 μL de H_2O libre de nucleasas (Invitrogen, Life Technologies), 0,6 μL de MgCl_2 50 mM (Sigma - Aldrich), 2 μL de amortiguador de Taq DNA polimerasa 10X (Tris HCl 100 mM y KCl 500 mM a pH 8.8), 0,5 μL de cada partidor a 10 μM , 0,8 μL de dNTPs 10 mM (Invitrogen, Life Technologies), 4 μL de Rojo Cresol 0,1 mM disuelto en Sacarosa 12% y 0,2 μL (1 U) de Taq DNA Polimerasa. Como templado se utilizó 1 μL de cDNA. Los partidores utilizados fueron SlyTCPB01 F y SlyTCPB01 R (Tabla 1), que amplifican un fragmento de 120 bp desde cDNA y un fragmento de 360 bp desde DNA genómico. El programa del RT-PCR comenzó con una denaturación inicial a 95 °C durante 2 min,

seguida de 35 ciclos de denaturación a 95 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s, para terminar con una extensión final a 72 °C durante 5 min. 10 µL del producto de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa según el protocolo descrito en la sección 2.3.7.

2.3.11 Cuantificación de la acumulación relativa de transcritos mediante RT-PCR cuantitativo

2.3.11.1 Evaluación de expresión ectópica de *VviAGL11* en hojas provenientes de líneas transformadas de *Solanum lycopersicum* mediante RT-qPCR.

A fin de corroborar que las líneas transformadas de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom regeneradas *in vitro* expresan el gen *VviAGL11* bajo control del promotor fuerte CaMV 35S, se realizó un RT-qPCR utilizando como templado cDNA proveniente de muestras de RNA de hojas. Cada reacción de 10 µL contiene 5 µL de Fast SYBR-Green® Master Mix (Applied Biosystems), 0,25 µL de cada partidor 10 µM, 1,5 µL de H₂O libre de nucleasas (Invitrogen, Life Technologies) y 3 µL de una dilución 1:3 de la muestra de cDNA como templado además, en cada experimento realizado se añadió un control sin templado. El gen normalizador utilizado fue el gen de referencia SAND (SAND family protein) de *Solanum lycopersicum* [Solyc03g115820.2], previamente validado por el equipo de trabajo para su uso en ensayos de cuantificación de la expresión génica en *Solanum lycopersicum*. Las combinaciones de partidores utilizadas fueron qVviAGL11-3F - qVviAGL11-3R (Tabla1), que amplifican un fragmento

de 270 bp del gen *VviAGL11*, y SlySAND01 F – SlySAND01 R, que amplifican un fragmento del gen de referencia SAND (Tabla 1). Cada reacción fue llevada a cabo en triplicado. El programa de RT-qPCR comenzó con una denaturación inicial a 95 °C por 20 s; seguida de 40 ciclos de denaturación a 95 °C durante 3 s e hibridación y extensión a 60 °C durante 30 s; para finalizar con una etapa de determinación de una curva de disociación, que consta de una etapa inicial de denaturación a 95 °C durante 15 s, seguida de un aumento progresivo de temperatura que va desde 60 a 95 °C en intervalos de 0,5 °C, para confirmar la especificidad de los partidores utilizados.

2.3.11.2 Determinación de los niveles de expresión relativa.

Los niveles de expresión relativa de los genes de interés fueron determinados utilizando el método del C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$) modificado, propuesto por Pfaffl en 2001, que permite evaluar los niveles de acumulación de mRNA del gen de interés experimental comparado con la acumulación de mRNA de un gen de referencia de expresión constitutiva. El modelo propone el cálculo de una razón de expresión relativa entre el gen objetivo y un gen de referencia, en función de la eficiencia de cada reacción de PCR determinada experimentalmente y de la diferencia entre el ciclo umbral (C_T) de cada muestra experimental y un calibrador interno, que actúa como una referencia de la expresión de un gen objetivo determinado, comparando la concentración relativa del mRNA del gen de interés con la de una muestra, como se muestra en la ecuación 1:

$$R = \frac{E^{C_{T \text{ calibrador}} - C_{T \text{ Gen objetivo}}}}{E^{C_{T \text{ calibrador}} - C_{T \text{ Gen de referencia}}}} \quad \text{Ec.1}$$

Donde R es la razón de expresión relativa, E es la eficiencia de cada reacción de PCR y C_T es el ciclo umbral de la reacción de PCR al cual la fluorescencia detectada por el equipo de PCR en tiempo real es significativamente mayor que la fluorescencia basal de la reacción. La eficiencia de amplificación de cada gen fue determinada previamente por el equipo de trabajo, de acuerdo a lo descrito por Pfaffl en 2001. Las eficiencias obtenidas fueron de 93,7% para el gen *SAND*, 94,1 % para el gen *SlyAGL11* y 87,2% para el gen *VviAGL11*. Como C_T calibrador se utilizó la media aritmética de los C_T obtenidos experimentalmente de cada gen.

2.3.11.3 Análisis de expresión de *VviAGL11* y *SlyAGL11* en flores y frutos en desarrollo de líneas transgénicas Tx mediante RT-PCR semi-cuantitativo para elección preliminar de muestras experimentales a analizar.

Dado que todas las líneas transgénicas analizadas mostraron expresión de *VviAGL11* en hojas (Ver sección 3.3.1 de resultados), con el propósito de reducir la complejidad y costo en el análisis de expresión desde flores y frutos en diferentes estados de desarrollo, se propuso una estrategia basada en el análisis preliminar del fenotipo de las líneas transgénicas y de la expresión semi-cuantitativa del transgen *VviAGL11* y del gen endógeno *SlyAGL11* en cuatro estados de desarrollo claves para

el desarrollo de los órganos florales y del fruto. En base a este análisis preliminar (Ver resultados en sección 3.6.1) se definieron los experimentos de expresión cuantitativa a realizar. En primera instancia, del total de 22 líneas transgénicas obtenidas, 9 de ellas fueron seleccionadas de manera que representen la mayor diversidad de fenotipos obtenidos, para su posterior análisis. Posteriormente, se extrajo RNA de botones y flores de las líneas seleccionadas en los estados 0, 1, 2 y 4 (Figura 4), definidos por Mazzucato y col. en 1998. A partir del cDNA sintetizado desde éstas muestras (la extracción de RNA y posterior síntesis de cDNA fueron realizados de acuerdo a los protocolos descritos en las secciones 2.3.11 y 2.3.12), se realizó un RT-PCR semi-cuantitativo para determinar de manera preliminar aquellos estados del desarrollo floral donde existieran variaciones significativas de los niveles de expresión tanto de *VviAGL11* como de *SlyAGL11* entre las distintas líneas seleccionadas. Como gen normalizador se utilizó el gen de referencia *SlyTCPB*. Cada reacción de 20 µL contenía 10,4 µL de H₂O libre de nucleasas (Invitrogen, Life Technologies), 0,6 µL de MgCl₂ 50 mM (Sigma - Aldrich), 2 µL de amortiguador Taq DNA polimerasa 10X (Tris HCl 100 mM y KCl 500 mM a pH 8.8), 0,5 µL de cada partidor a 10 µM, 0,8 µL de dNTPs 10 mM (Invitrogen, Life Technologies), 4 µL de Rojo Cresol 0,1 mM disuelto en Sacarosa 12% y 0,2 µL (1 U) de Taq DNA Polimerasa. Como templado se utilizó 1 µL de cDNA. El programa del RT-PCR comenzó con una denaturación inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 30 o 35 ciclos de denaturación a 95 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s, para terminar con una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los genes *TCPB* y *VviAGL11* fueron amplificados durante 30 ciclos, utilizando los partidores *SlyTCPB01 F* y *SlyTCPB01 R* para el gen *TCPB*, y los

partidores qVviAGL11_3 F y qVviAGL11_3 R para el gen *VviAGL11* (Tabla 1). El gen *SlyAGL11* fue amplificado durante 35 ciclos utilizando los partidores SGN-E746992 03 F y SGN-E746992 03 R (Tabla 1) 10 μ L del producto de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% según el protocolo descrito en la sección 2.3.7. Los niveles de expresión relativa fueron determinados mediante el análisis informático de la intensidad de las bandas obtenidas como resultado de la visualización por electroforesis. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ImageJ, disponible en <http://imagej.nih.gov/ij/> (Bemer y col., 2012).



Figura 4: Estados de desarrollo analizados en *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom. Estado 0, botones florales de 1 – 2,9 mm. Estado 1, botones florales de 3 – 5,9 mm. Estado 2, flores en apertura de 6 – 10 mm. Estado 3, Antesis. Estado 4, 8 días post antesis (8dpa). Los estados fueron definidos de acuerdo a Mazzucato y col. (1998).

2.3.11.4 Análisis de expresión de *VviAGL11* y *SlyAGL11* en flores y frutos en desarrollo mediante RT-qPCR

Los niveles de expresión del gen de interés *VviAGL11* y del gen endógeno *SlyAGL11* en dos estados del desarrollo floral y del fruto fueron determinados por RT-qPCR utilizando como template cDNA proveniente de muestras de RNA de los

estados 0 y 4. La evaluación de la expresión génica en las líneas transgénicas fue realizada en tres réplicas biológicas. Además cada reacción fue llevada a cabo en triplicado. Cada reacción de 10 μ L contenía 5 μ L de Fast SYBR-Green[®] Master Mix (Applied Biosystems), 0,25 μ L de cada partidor 10 μ M, 1,5 μ L de H₂O libre de nucleasas (Invitrogen, Life Technologies) y 3 μ L de una dilución 1:3 de la muestra de cDNA como templado. Además, en cada reacción se añadió un control sin templado. El gen normalizador utilizado fue el gen de referencia *SAND*. Las combinaciones de partidores utilizadas fueron qVviAGL11_3F - qVviAGL11_3R (Tabla 1), que amplifican un fragmento de 270 bp del gen *VviAGL11*, SlySAND01 F – SlySAND01 R, que amplifican un fragmento de 160 bp del gen de referencia *SAND* y SGN-E746992 03 F - SGN-E746992 03 R, que amplifican un fragmento de 100 bp del gen endógeno *SlyAGL11*. El programa de RT-qPCR comenzó con una denaturación inicial a 95 °C por 20 s; seguida de 40 ciclos de denaturación a 95 °C durante 3 s e hibridación y extensión a 60 °C durante 30 s; para finalizar con una etapa de determinación de una curva de disociación, que consta de una etapa inicial de denaturación a 95 °C durante 15 s, seguida de un aumento progresivo de temperatura que va desde 60 a 95 °C en intervalos de 0,5 °C, para confirmar la especificidad de los productos obtenidos. Los niveles de expresión relativa fueron determinados de acuerdo al método propuesto por Pfaffl en 2001 (Sección 2.3.11.2)

2.3.11.5 Determinación del número de copias del transgen integradas en el genoma de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom.

Con el fin de realizar comparaciones de expresión y fenotípicas entre líneas

transgénicas con igual número de copias y a partir de ellas los diversos análisis de asociación, se realizó la determinación del número de copias integradas del gen de interés de acuerdo al método descrito por Ji y col.(2012), este propone que a partir de la ecuación representativa de una reacción de PCR propuesta por Ji y col. (2000), se puede establecer una relación lineal entre la razón logarítmica entre un gen de referenciade copia única y el gen de interés experimental, y la diferencia entre los C_T obtenidos a partir de RT-qPCR para cada gen (Ecuación 2), de modo que:

$$\log_2\left(\frac{C_{gen A}}{C_{gen B}}\right) = \alpha(C_T gen A - C_T gen B) + \beta \quad \text{Ec.2}$$

Donde C_{es} la concentración inicial de templado, C_T es el ciclo umbral, α y β son constantes determinadas experimentalmente, que corresponden a la pendiente de la curva y al intercepto de la curva con el eje de las ordenadas.

De esta forma, reordenando la ecuación 2, se puede obtener una ecuación que permita calcular la razón de concentración de ambas especies en función de la diferencia entre sus C_T , de manera que:

$$\frac{C_{gen A}}{C_{gen B}} = 2^{\alpha(C_T gen A - C_T gen B) + \beta} \quad \text{Ec.3}$$

El número de copias del transgen está determinado por la diferencia entre los C_T del gen normalizador de copia única (En este caso, *LAT52*. Yang y col. (2005)) y del

gen de interés, bajo el supuesto de que cuando la eficiencia de cada reacción es ideal e idéntica se puede establecer una relación lineal entre la concentración de ambas especies y la diferencia entre sus C_T . De esta forma, la razón entre el gen de referencia de copia única y el gen de interés viene dada por:

$$R = \frac{[LAT52]}{[Gen\ de\ interés]} = \frac{Nc\ LAT52}{Nc\ Gen\ de\ interés} = \frac{1}{Nc\ Gen\ de\ interés} \quad \text{Ec.3}$$

Donde Nc es el número de copias de un gen, y R es la razón entre las concentraciones del gen de referencia de copia única y el gen de interés, determinada por la diferencia entre los C_T de ambos genes.

Combinando y reordenando las ecuaciones 2 y 3, se obtiene la ecuación final que determina el número de copias del gen de interés:

$$Nc_{gen\ objetivo} = \frac{1}{2^{\alpha(C_T\ LAT52 - C_T\ gen\ objetivo) + \beta}} \quad \text{Ec.4}$$

Para determinar el número de copias de las muestras experimentales, en primera instancia, a partir de DNA genómico de las líneas transgénicas, se amplificó por PCR convencional un fragmento de 90 bp del gen de copia única *LAT52* (que codifica una proteína putativa de 18 kDa rica en cisteína) y un fragmento de 137 bp del gen *HPT* de resistencia a higromicina, presente en la construcción pGWB2/35S/viAGL11. Las secuencias y detalles de ambos pares de partidores se encuentran en la Tabla 1. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las mismas que las utilizadas en la sección 2.3.10. Los productos de PCR obtenidos fueron



purificados mediante su precipitación con acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 7,5 M (Sección 2.3.8). 5 μL del producto de PCR purificado de cada reacción fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa. El resto del producto purificado fue cuantificado por espectrofotometría midiendo su absorbancia a $\lambda=260$ nm. El coeficiente de extinción molar del producto de PCR, usado para determinar la concentración molar de éste de acuerdo a la ley de Lambert-Beer, fue calculado utilizando la herramienta "UV Spectrum of DNA" disponible en <http://biophysics.idtdna.com/UVSpectrum.html>. Con los datos obtenidos se calculó la concentración molar del producto de PCR de ambas reacciones. Posteriormente, a partir de cada producto de PCR a una concentración de 10 nM, se realizaron siete diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000, 1/1.000.000, 1/10.000.000). Estas diluciones fueron utilizadas para ensayos de RT-qPCR. Cada reacción de 10 μL contenía 5 μL de Fast SYBR-Green[®] Master Mix (Applied Biosystems), 0,25 μL de cada partidor 10 μM , 2,5 μL de H_2O libre de nucleasas (Invitrogen, Life Technologies) y 2 μL de cada dilución como templado. El programa de RT-qPCR comenzó con una denaturación inicial a 95 °C por 20 s; seguida de 40 ciclos de denaturación a 95 °C durante 3 s e hibridación y extensión a 60 °C durante 30 s; para finalizar con una etapa de determinación de una curva de disociación, que consta de una etapa inicial de denaturación a 95 °C durante 15 s, seguida de un aumento progresivo de temperatura que va desde 60 a 95 °C en intervalos de 0,5 °C, para confirmar la especificidad de los partidores.

2.4 Partidores utilizados.

Los partidores utilizados para las distintas reacciones tanto de PCR como de síntesis de cDNA se muestran en la Tabla 1. Todos los partidores utilizados en el desarrollo del trabajo se encontraban disponibles en el laboratorio.

Tabla 1: Secuencia de partidores utilizados

Gen objetivo	Partidores	Secuencia 5' → 3'	Tm [°C]	Tamaño esperado (bp)
<i>SlyAGL11</i>	SGN-E746992 F03	CCATCTGGTGGGGAAGAGTA	60	113
	SGN-E746992 R03	TGATCAGGAGACAATGGATCA		
<i>VviAGL11</i>	VviAGL11_8F	ATGGGGAGAGGAAAGATCGA	60	700
	VviAGL11_8R	TTACCCGAGATGGAGGACCT		
	qVviAGL11_3F qVviAGL11_3R	GCAGAAGTTGCCCTCATCGT AAGCCAAGGAATCACCCATT		
CAC	SlyCAC 03 F	TCCAGGGCAAACCTGAATCAA	60	378
	SlyCAC 03 R	AGAAACCGAACACGCAATCC		
<i>CaMV 35S</i>	35Su F	AAGATACAGTCTCAGAAGACC	60	264
	35Su R	TTGAAGACGTGGTTGGAACGT		
-	Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTAGCTTCG	60	-
<i>TCPB</i>	SlyTCPB 01 F	GGAAAAGGGTGAGCGAGCTA	60	120
	SlyTCPB 01 R	CCTCTGCCTGTTGATTGCAG		
<i>SAND</i>	SlySAND 01 F	GCGGGTGAAAGAGGGGAGTAG	60	160
	SlySAND 01 R	CCATTGCACCTGAGAGTTCG		
<i>LAT52</i>	LAT52_1 F	AGACCACGAGAACGATATTTGC	60	92
	LAT52_1 R	TTCTTGCCTTTT CATATCCAGACA		
<i>HPT</i>	HPT_L F	CATATGAAATCACGCCATGTAG	60	137
	HPT_L R	TGTATTGA GAACTGCCCCGCTGTTCTGCA		

2.5 Caracterización fenotípica de flores y frutos en desarrollo de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom.

La caracterización fenotípica de flores de plantas T₁ de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom que expresan el gen *VviAGL11* bajo control del promotor fuerte CaMV 35S tomó en cuenta la arquitectura general de las plantas, aspectos vegetativos como la altura, análisis cualitativo de flores y frutos en desarrollo, a través del registro de fotografías de aquellas estructuras que presentaron cambios morfológicos mayores y análisis cuantitativos como el peso de las semillas y frutos en desarrollo. La caracterización fenotípica de frutos de plantas T₁ consistió en la medición del diámetro ecuatorial y de la masa de 10 frutos por línea experimental, como indicadores de tamaño. Además, se extrajeron las semillas de cada uno de los frutos para su posterior caracterización. Se midió el peso fresco del total de semillas por fruto, para luego ser contadas. Luego, se analizó la forma y tamaño de más de 150 semillas por línea experimental utilizando el software SmartGrain disponible en <http://phenotyping.image.coocan.jp/smartgrain/index.html>. (Tanabata y col., 2012)

2.6 Análisis estadístico.

Los datos de expresión relativa, así como los datos de caracterización fenotípica de bayas y semillas fueron graficados y analizados mediante el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

Para el análisis de expresión relativa, se utilizó el test de ANOVA de una vía para determinar si existía una variación significativa ($p < 0,05$) en los promedios de cada

conjunto de datos con corrección de Bonferroni, para evaluar si las diferencias entre el promedio de las réplicas era significativo ($p < 0,05$). Las diferencias significativas fueron indicadas con letras según la homogeneidad de los grupos comparados.

El análisis de la caracterización fenotípica de semillas fue realizado a través de ANOVA de una vía, seguido de un post test de Tukey de comparación múltiple, para dar cuenta de las diferencias significativas entre las diferentes líneas analizadas ($p < 0,05$). Además, los datos obtenidos a partir del análisis de imágenes de las semillas fueron sometidos a un análisis de componentes principales, realizado con el software InfoStat (<http://www.infostat.com.ar/index.php>, Anexo 1).

3. RESULTADOS

3.1 Transformación genética estable de *Solanum lycopersicum* cv.

Micro-Tom

Se obtuvieron 22 líneas T₀ transformadas con el vector para expresar el gen *VviAGL11* bajo control del promotor fuerte CaMV 35S.

Posteriormente, se obtuvieron 29 líneas transformantes T₁ a partir de semillas (generadas por autopolinización) de siete de estas líneas transgénicas T₀. Estas semillas fueron sembradas en medio de selección con higromicina 10 mg/L.

Los resultados de la transformación, regeneración *In vitro* y aclimatación de las líneas transformadas T₀ y T₁ se muestran en la Figura 5.

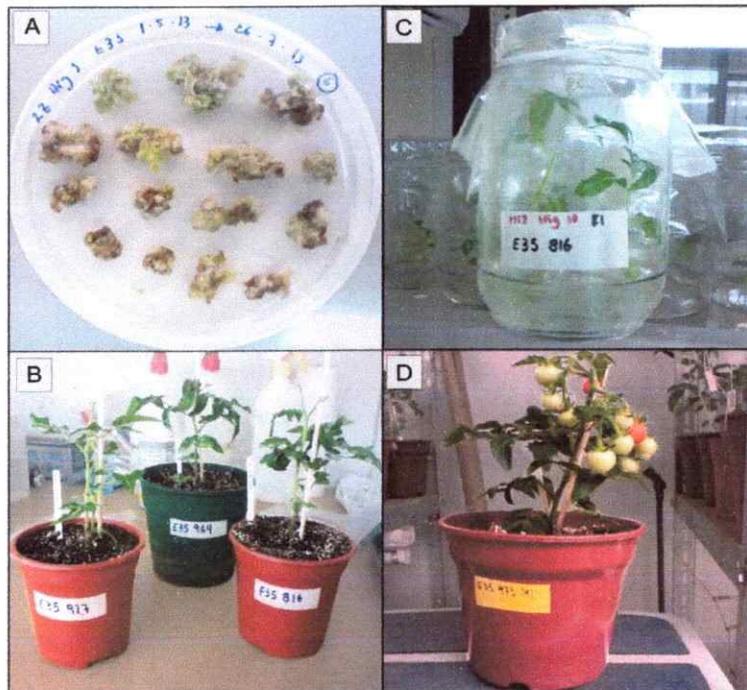


Figura 5: Desarrollo de líneas transgénicas estables de tomate obtenidas mediante organogénesis somática. A – B, Resultados de la transformación estable de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom con la construcción 35S/VviAGL11. En A se muestran brotes generados sobre callos producto de la organogénesis somática inducida por hormonas. En B se muestran plantas de tomate transformadas (T_0) aclimatadas a la cámara de crecimiento experimental. C – D, Resultados de la germinación de semillas de plantas T_0 y generación de líneas T_1 . En C se muestra una plántula obtenida a partir de la germinación *in vitro* de semillas de las líneas T_0 en medio de selección con higromicina. En D se muestra una planta T_1 aclimatada, establecida en cámara de crecimiento experimental.

3.2 Caracterización molecular de líneas transgénicas estables.

3.2.1 Caracterización molecular de las líneas T₀ transformadas con la construcción pGWB2/35S/VviAGL11.

Las 22 líneas transgénicas generadas a partir de la transformación de explantes de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom con la construcción pGWB2/35S/VviAGL11 fueron analizadas mediante PCR convencional para la confirmación de la integración del transgen en su genoma. En primera instancia, se extrajo DNA genómico de hojas de las líneas transformadas, que fue utilizado para el análisis, como se muestra en la Figura 6.

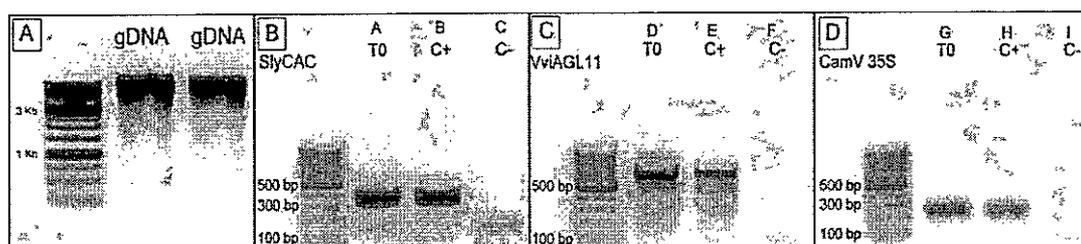


Figura 6: Validación de transformación genética de líneas T₀ transformadas con 35S/VviAGL11 mediante PCR. A, Muestra representativa de la extracción de DNA genómico de hojas de las 22 líneas T₀. B – D, PCR convencional para confirmación de transgénesis. En B se muestra la verificación de la integridad del DNA extraído mediante la amplificación del fragmento de 378 bp del gen CAC. Como control positivo (C+) se utilizó DNA genómico de tomate previamente verificado en el laboratorio. El control negativo utilizado corresponde al control sin templado. En C se muestra la amplificación del fragmento de 700 bp correspondiente al gen *VviAGL11* de *Vitis vinifera*. Como control positivo (C+) se utilizó una alícuota del vector pGWB2/35S/VviAGL11. El control negativo utilizado corresponde al control sin templado. En D se muestra la amplificación del fragmento de 270 bp del promotor CamV 35S. Como control positivo (C+) se utilizó una alícuota del vector pGWB2/35S/VviAGL11. Los resultados obtenidos en cada caso fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en A, y en

gel de agarosa al 2% en B, C y D. Cada corrida electroforética fue realizada en amortiguador TAE 1X a 110 V, en un periodo de tiempo entre 25 a 35 min.

Los resultados obtenidos a partir del análisis por PCR permiten verificar que las 22 líneas experimentales T₀ obtenidas son transgénicas. En virtud de esos resultados se procedió a evaluar si todas las líneas T₀ expresaban el gen *VviAGL11*. Para ello, se extrajo RNA total de hojas y se sintetizó el cDNA para determinar mediante RT-PCR si las líneas T₀ obtenidas expresan el gen *VviAGL11*. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 7.

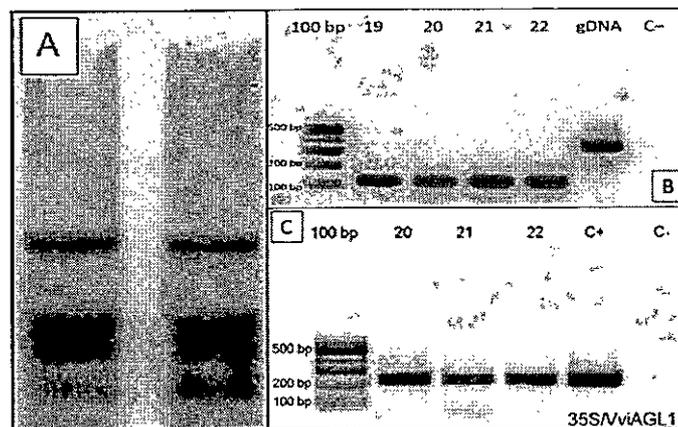


Figura 7: Análisis de expresión de *VviAGL11* en hojas delíneas transgénicas T₀. A, muestra representativa de la extracción de RNA total de las 22 líneas T₀ obtenidas. Los resultados confirman la integridad del RNA extraído. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel denaturante de agarosa al 1,5%. La corrida electroforética fue realizada en amortiguador MOPS 1X a 80 V, durante 45 min. B, Muestra representativa de la validación de la integridad del cDNA sintetizado, y la carencia de contaminación con DNA genómico. El fragmento de 120 bp corresponde a un fragmento del gen *SlyTCPB*. El fragmento de 360 bp corresponde a un fragmento del gen *SlyTCPB* amplificado desde DNA genómico de *Solanum lycopersicum*. C, Muestra representativa del análisis de expresión de *VviAGL11* en las 22 líneas transgénicas T₀ mediante RT-PCR. El producto

amplificado de aproximadamente 230 bp corresponde a un fragmento del gen *VviAGL11* de *Vitis vinifera*. Como control positivo se utilizó una alícuota del vector pGWB2/35S/*VviAGL11*. El control negativo corresponde al control sin templado. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Cada corrida electroforética fue realizada en amortiguador TAE 1X a 110 V, en un período de tiempo entre 25 a 35 min.

Los resultados obtenidos a partir del RT-PCR revelaron que las 22 líneas T_0 expresan el gen *VviAGL11* de *Vitis vinifera*.

Debido a factores ambientales (exceso de humedad entre otros) y condiciones experimentales (imposibilidad de garantizar esterilidad de sustratos, e imposibilidad de eliminar por completo agentes fitopatogénicos), las líneas experimentales T_0 fueron infectadas con el hongo fitopatogénico *Fusarium oxysporum* que es letal a largo plazo y difícil de controlar aún con programas fitosanitarios, hecho que provocó la muerte de gran parte de ellas. Siendo inminente el desenlace, se recolectaron semillas de siete líneas T_0 que posteriormente fueron sembradas y establecidas como líneas T_1 . Finalmente, cuatro líneas experimentales T_0 sobrevivieron a la infección de *Fusarium oxysporum*, y fueron conservadas para los análisis fenotípicos en conjunto con las líneas T_1 .

3.2.2 Caracterización molecular de las líneas T_1 transformadas con la construcción pGWB2/35S/*VviAGL11*.

Las 29 líneas transgénicas T_1 obtenidas a partir de semillas de 7 líneas T_0 fueron analizadas mediante PCR convencional para confirmar la herencia del transgen. Se extrajo DNA genómico de hojas de las líneas experimentales T_1 , que fue utilizado

para el análisis como se describió en la sección anterior. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8.

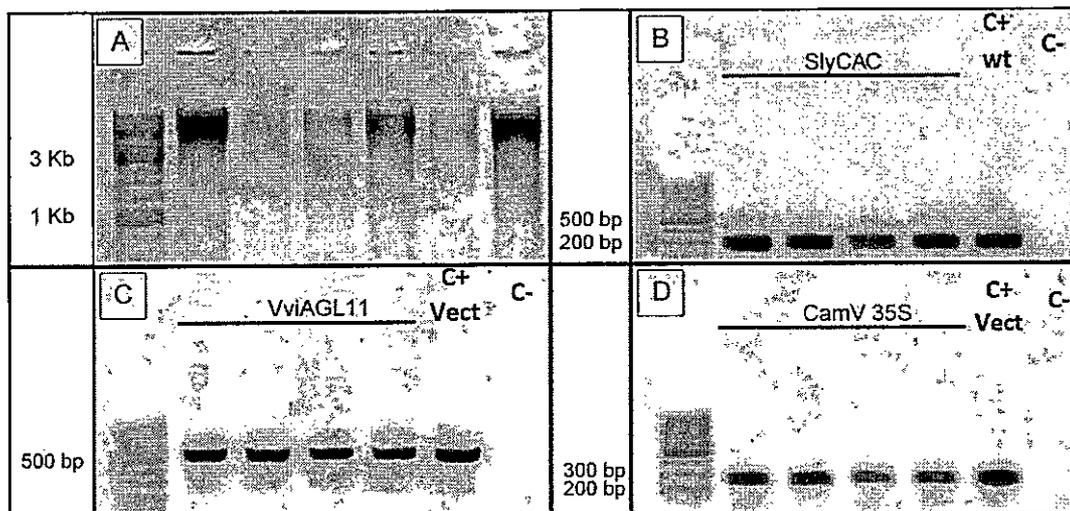


Figura 8: Validación de transformación genética de líneas T1 transformadas con 35S/VviAGL11 mediante PCR. A, Muestra representativa de la extracción de DNA genómico de hojas de 4 de las 29 líneas transgénicas T₁. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. La corrida electroforética fue realizada en amortiguador TAE 1X a 110 V, en un período de tiempo entre 25 a 35 min. B – D, PCR convencional para confirmación de transgénesis. En B se muestra la comprobación de la integridad del DNA extraído mediante la amplificación del fragmento de 378 bp del gen CAC. Como control positivo (C+) se utilizó DNA genómico de tomate previamente validado en el laboratorio. El control negativo utilizado corresponde al control sin templado. En C se muestra la amplificación del fragmento de 700 bp correspondiente al gen *VviAGL11* de *Vitis vinifera*. Como control positivo (C+) se utilizó una alícuota del vector pGWB2/35S/VviAGL11. El control negativo utilizado corresponde al control sin templado. En D se muestra la amplificación del fragmento de 270 bp del promotor fuerte CaMV 35S. Como control positivo (C+) se utilizó una alícuota del vector pGWB2/35S/VviAGL11. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Cada corrida electroforética fue realizada en amortiguador TAE 1X a 110 V, en un período de tiempo entre 25 a 35 min.

Los resultados obtenidos a partir del análisis por PCR convencional permitieron verificar que las 29 líneas experimentales T₁ obtenidas heredaron la construcción pGWB2/35S/VviAGL11 de manera efectiva. En base a estos resultados se procedió a evaluar si las líneas T₁ expresan el gen *VviAGL11*. Para ello, se extrajo RNA total desde hojas, este fue utilizado para la síntesis de cDNA con el fin de analizar la expresión bajo control del promotor fuerte CaMV 35S mediante RT-qPCR. En el análisis se incluyó una de las 4 líneas T₀ supervivientes (L1), seleccionada en función de su fenotipo (mayoritariamente aberrante de flores y frutos en comparación con el resto de las líneas supervivientes). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.

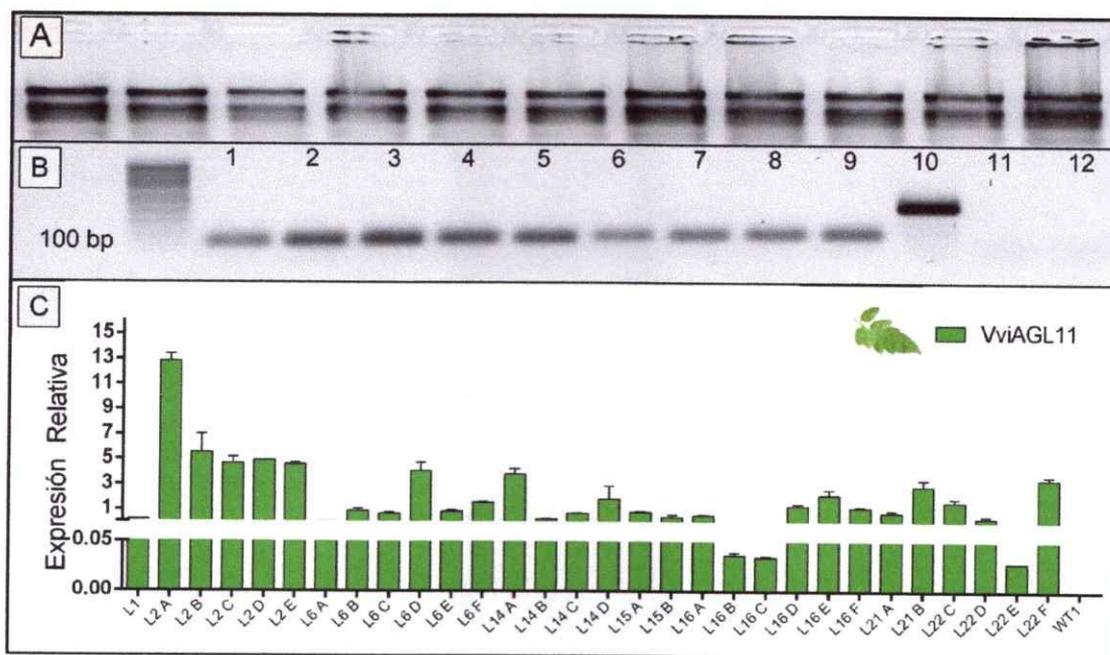


Figura 9: Expresión de *VviAGL11* en hojas de líneas T₁. A, Muestra representativa de la extracción de RNA de hojas de las 29 líneas T₁. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel denaturante de agarosa al 1,5 %. La corrida electroforética fue

realizada en amortiguador MOPS 1X a 80 V, durante 45 min. **B**, Muestra representativa del RT-PCR realizado para validar la integridad del cDNA sintetizado. El fragmento de 120 bp corresponde a un fragmento del gen *SlyTCPB*. En el carril 10 se muestra un amplificado de 360 bp que corresponde a un fragmento del gen *SlyTCPB* amplificado desde DNA genómico de *Solanum lycopersicum*. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Cada corrida electroforética fue realizada en amortiguador TAE 1X a 110 V, en un período de tiempo entre 25 a 35 min. **C**, Niveles de acumulación de transcritos de *VviAGL11* en hojas, la cuantificación fue normalizada contra *SlySAND* en las 29 líneas experimentales T_1 y en la línea experimental $T_0(L1)$. La cuantificación se realizó mediante RT-qPCR utilizando tres réplicas técnicas

Los resultados obtenidos a partir del análisis por RT-qPCR permiten corroborar que las 29 líneas transgénicas T_1 (además de la línea experimental $T_0(L1)$) expresan el gen *VviAGL11* de *Vitis vinifera*.

3.3 Caracterización fenotípica de líneas T_0 y T_1 que expresan *VviAGL11* bajo control del promotor fuerte CaMV 35S.

La caracterización fenotípica de las líneas experimentales que expresan el gen *VviAGL11* de *Vitis vinifera* bajo control del promotor fuerte CaMV 35S fue realizada, en primera instancia, de manera cualitativa a través del registro de fotografías (no mostradas) de las estructuras vegetativas de la planta, no se encontraron modificaciones significativas que puedan ser atribuidas al efecto del transgen. En una segunda instancia se caracterizaron también a través de un registro fotográfico los cambios en la morfología de las estructuras reproductivas en las 29 líneas transgénicas T_1 y en las líneas T_0 supervivientes, con respecto a las plantas silvestres. La mayoría de los cambios morfológicos apreciables se registraron a nivel del desarrollo de los

órganos florales, como se muestra en la Figura 10:

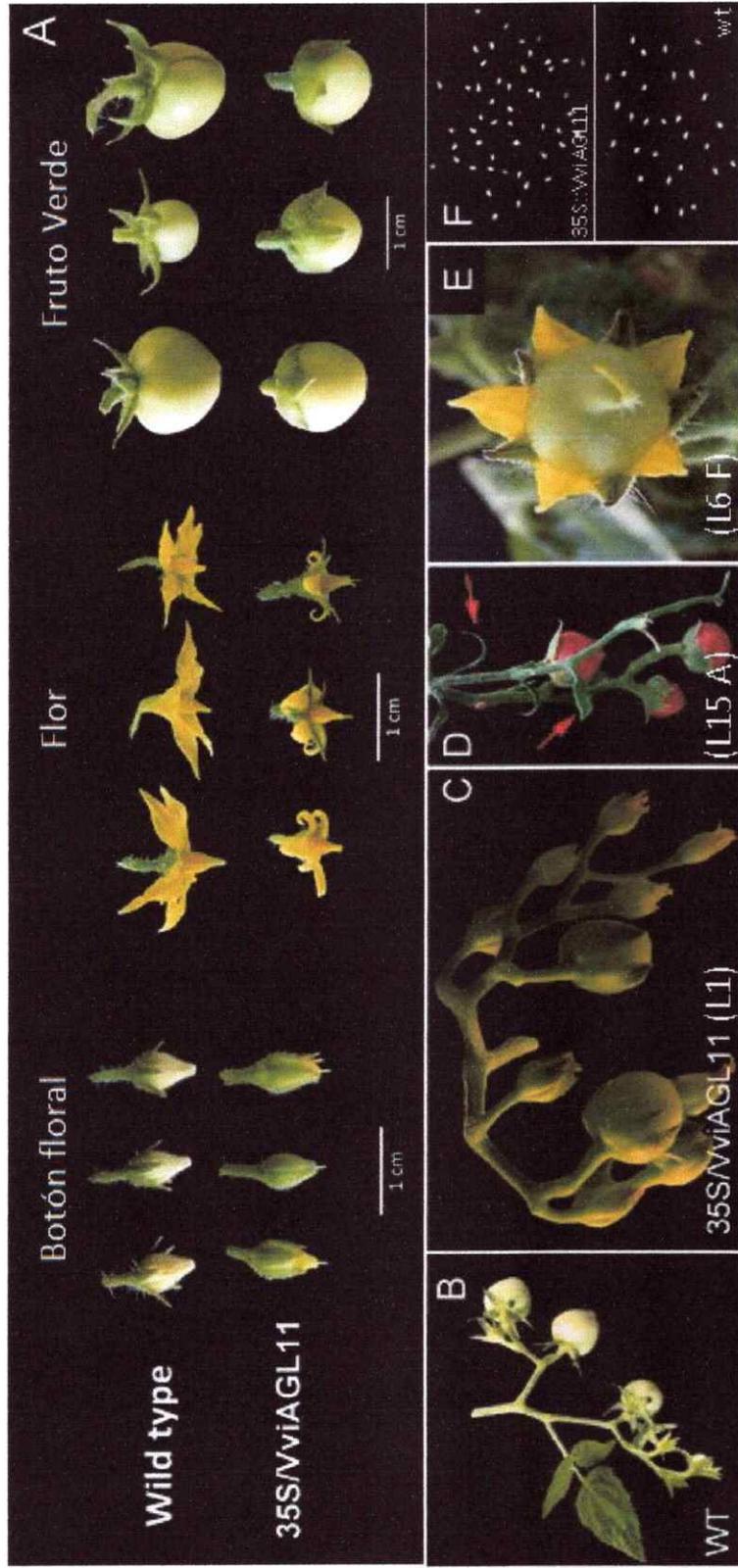


Figura 10: Caracterización fenotípica de la estructura de los órganos reproductivos de líneas transgénicas T_0 y T_1 que expresan el gen *VviAGL11* bajo control del promotor *CaMV 35S*. **A**, Cambios morfológicos observados a lo largo del desarrollo de flores y frutos. Las plantas que expresan *VviAGL11* bajo control del promotor fuerte *CaMV 35S* presentan alteraciones morfológicas a nivel de sus órganos reproductivos, mostrando sépalos engrosados que tienden a no abrirse, carpelos prominentes o sobre-desarrollados desde etapas tempranas del desarrollo, engrosamiento de pétalos, entre otras. Las fotos mostradas son una mezcla de las líneas L14C, L14D y L15A **B-D**, Alteraciones morfológicas en inflorescencias. En B se observa una inflorescencia de planta silvestre con desarrollo normal. En C y D se observan inflorescencias con morfología alterada, destacándose la presencia de estructuras foliáceas en D (flechas rojas). **E**, Fruto en desarrollo con fenotipo aberrante, con desarrollo simultáneo de pétalos y baya. **F**, muestra representativa de semillas provenientes de plantas transformadas y silvestres. A simple vista, no se aprecian cambios morfológicos importantes en el desarrollo.

Los efectos fenotípicos evidenciados muestran alteraciones a lo largo del desarrollo de los órganos florales en algunas líneas transgénicas. Estas variaciones, presentes desde etapas tempranas del desarrollo del botón floral, se mantienen hasta que el fruto alcanza su madurez. Además de lo anterior, en algunos casos se observó la generación de tallos ectópicos con generaciones sucesivas de flores ectópicas, como se muestra en la Figura 11.

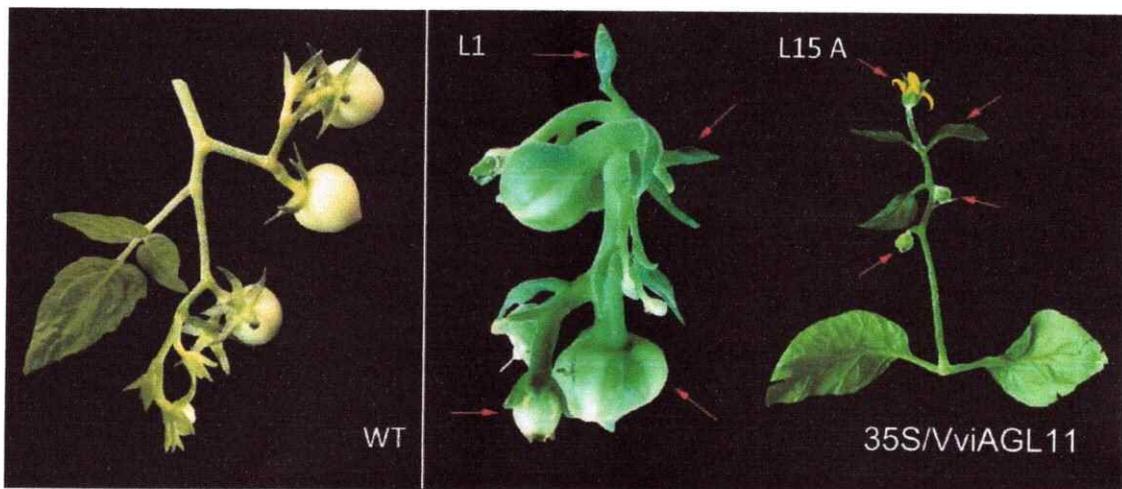


Figura 11: Tallos ectópicos generados en líneas que expresan el gen *VviAGL11* bajo control del promotor fuerte *CaMV 35S*. En la figura se muestra la generación sucesiva de flores ectópicas y estructuras foliáceas en tallos ectópicos sobre inflorescencias (indicados con flechas rojas) de dos líneas de *Solanum lycopersicum* transformada, en comparación con la planta silvestre.

Los cambios morfológicos observados se manifestaron tanto en las líneas experimentales T_0 como en T_1 , sugiriendo que las alteraciones fenotípicas registradas no se deben a variaciones somaclonales inducidas por el cultivo *in vitro* y organogénesis. Por otro lado, no todas las líneas experimentales analizadas presentan

alteraciones fenotípicas, a pesar de que expresan el gen *VviAGL11* en hojas y, las alteraciones fenotípicas observadas no muestran una correlación directa con los niveles de expresión relativa del gen *VviAGL11* en hojas.

Inicialmente se contempló el análisis de expresión y fenotípico en las líneas que presentaran una expresión contrastante de *VviAGL11*. Dado que no se encontró preliminarmente una correlación entre los niveles de acumulación de transcrito de *VviAGL11* en hojas con el fenotipo de las flores y frutos en desarrollo, se diseñó una estrategia experimental para analizar la expresión de los genes *SlyAGL11* y *VviAGL11* en distintas etapas del desarrollo floral y del fruto. En primera instancia, del total de líneas transgénicas (cuatro líneas T₀ y 29 líneas T₁), se seleccionaron nueve líneas para los análisis posteriores en función de sus atributos fenotípicos: tres de ellas (L2 A, L2 E, L6 C) presentan fenotipo de flores similar al de las flores silvestres, aun cuando los análisis por PCR convencional y por RT-qPCR indican que las líneas presentan expresión del gen *VviAGL11*, y seis líneas (L6 F, L14 C, L14 D, L15 A, L16 D, L1) que muestran alteraciones morfológicas en sus órganos florales. Además, de las nueve líneas seleccionadas, la línea 1 (L1) corresponde a una línea T₀, mientras que las 8 restantes corresponden a líneas T₁. Además del análisis de expresión de los genes *SlyAGL11* y *VviAGL11* en distintos estados de desarrollo floral, se realizó la caracterización fenotípica de frutos maduros y de semillas en las nueve líneas seleccionadas.

3.3.1 Caracterización fenotípica de frutos maduros.

La caracterización fenotípica de frutos maduros consistió en el registro del tamaño de los frutos transgénicos. En cada línea experimental el tamaño se caracterizó como la masa promedio del fruto y como el diámetro ecuatorial, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12, donde el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los frutos provenientes de líneas transformadas y los frutos provenientes de plantas silvestres.

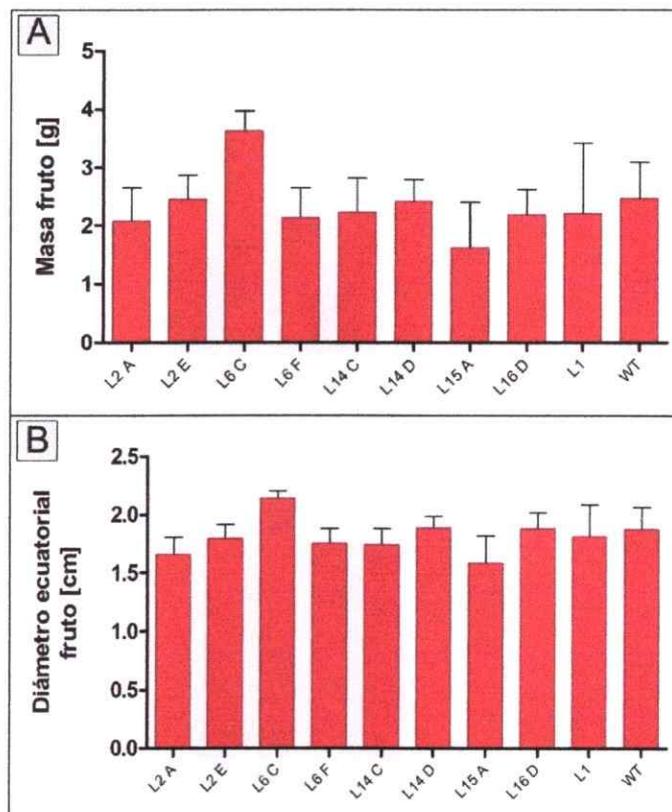


Figura 12: Tamaño de frutos provenientes de líneas transgénicas que expresan *VviAGL11* bajo control del promotor fuerte *CaMV 35S*. A, Masa de frutos por línea. B, Diámetro ecuatorial de frutos por línea. En cada caso, los datos presentados representan al valor

promedio por línea experimental analizada. Se analizaron 10 frutos por línea experimental. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre el tamaño de frutos silvestres y de frutos provenientes de líneas transformadas. El tamaño de los frutos fue evaluado mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía y post-test de Tukey ($p < 0,05$).

Algunos efectos morfológicos evidenciados en el fruto maduro podrían manifestarse como consecuencia de una alteración morfológica durante el desarrollo de los órganos florales en etapas tempranas del desarrollo, una de las alteraciones podría ser la partenocarpia debido a estructuras florales alteradas que impiden la correcta polinización, el desarrollo de estos tomates se ilustra en la Figura 13:

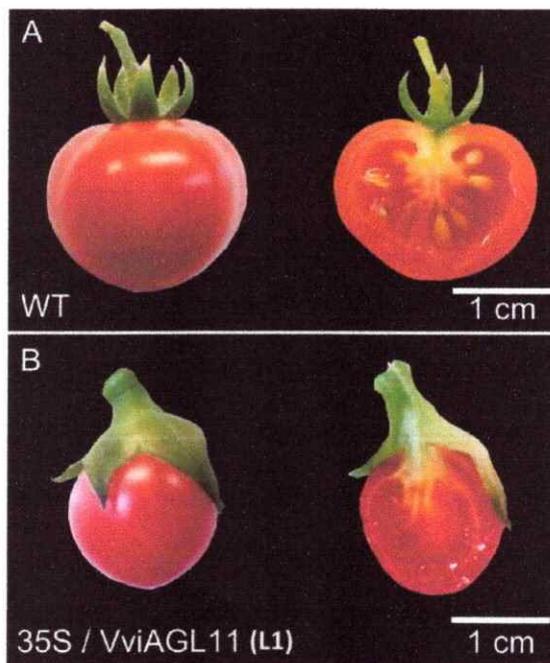


Figura 13: Efecto de la alteración en la estructura de los órganos florales sobre el desarrollo de las semillas y el fruto. Algunas líneas experimentales transformadas (L1, L14 C, L14 D, L15 A) presentaron cambios morfológicos importantes en el desarrollo de sus órganos reproductivos en comparación con la planta silvestre, hecho que podría conducir a una ausencia de polinización y repercutir en el desarrollo posterior de bayas y semillas. **A**, fruto silvestre. **B**,

de polinización y repercutir en el desarrollo posterior de bayas y semillas. A, fruto silvestre. B, fruto partenocárpico perteneciente a una línea experimental transformada (L1), con engrosamiento de sépalos, reducción del tamaño y disminución del número de semillas.

El fruto mostrado en la Figura 13, perteneciente a la línea L1, posee un menor tamaño con respecto a un fruto silvestre, y presenta además una disminución del número de semillas desarrolladas e incluso, en algunos casos, ausencia total de ellas (partenocarpia), posiblemente debido a la ausencia de polinización y/o fertilización causados a su vez por el impedimento físico que produce el engrosamiento y la fusión de sus sépalos, que dificultan el florecimiento normal del botón floral. Este fenómeno también fue observado en las líneas L14 C, L14 D y L15 A.

3.3.2 Caracterización fenotípica de semillas

Al realizar una evaluación únicamente visual las semillas provenientes de las líneas transgénicas y sin transformar no fue posible detectar variaciones morfológicas significativas que hayan afectado el desarrollo de semillas. En una segunda instancia la evaluación fenotípica se realizó mediante el análisis de fotografías de semillas recolectadas de cada línea experimental. El análisis fue realizado utilizando el programa SmartGrain (<http://www.nias.affrc.go.jp/qtl/SmartGrain/>; Tanabata y col., 2012), que entrega como resultado datos de distintos parámetros de importancia para la caracterización morfológica de semillas, como el área, perímetro, circularidad, entre otras. Además, se registró el número de semillas promedio por cada línea experimental, y la masa promedio de cada semilla. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14.



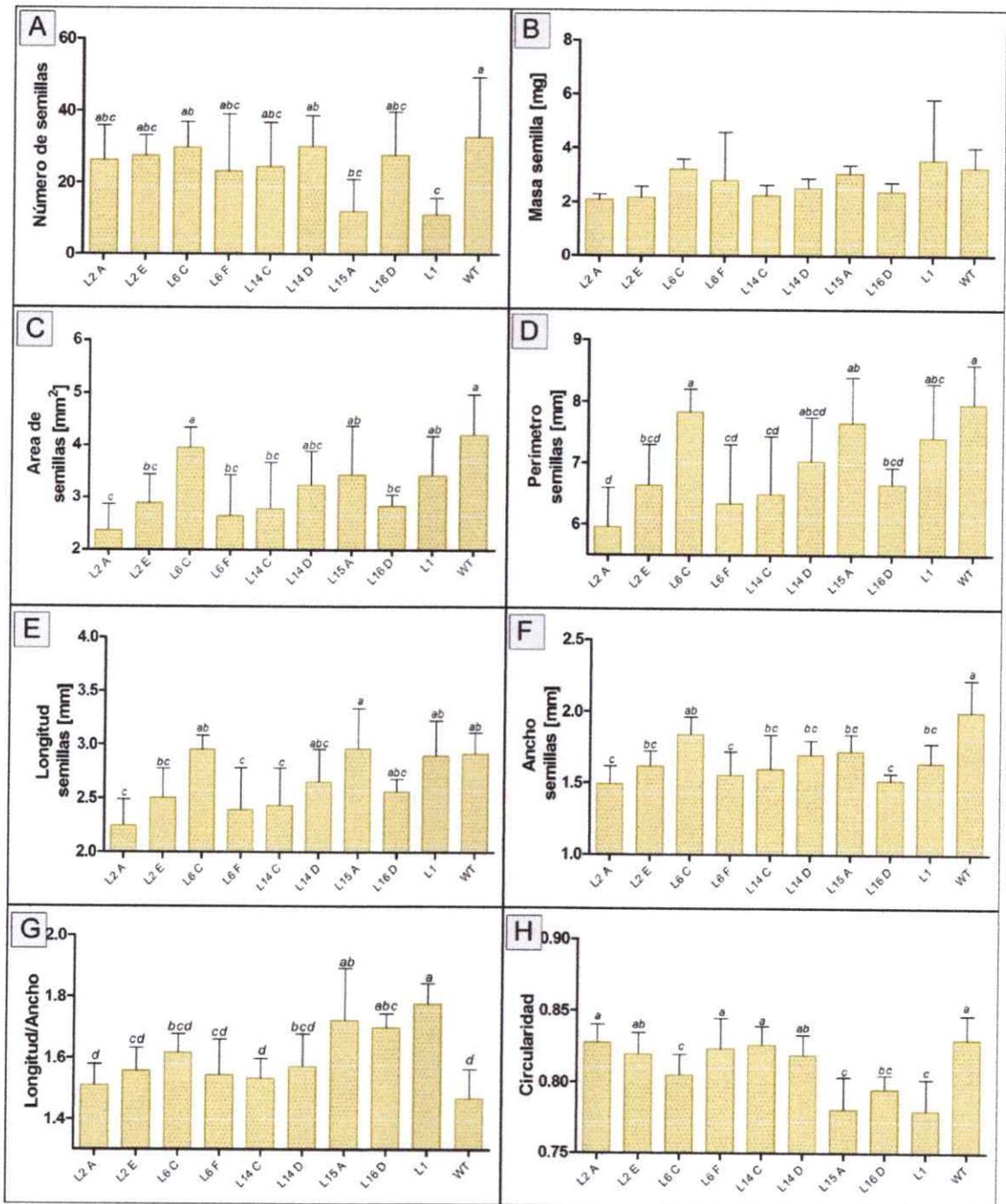


Figura 14: Caracterización fenotípica de semillas. A, Número de semillas por línea. B, Masa de semillas por línea. El análisis estadístico realizado reveló que no existen diferencias

significativas entre las distintas líneas. C, Área de semillas por línea. D, Perímetro de semillas por línea. E, Longitud de semillas por línea. F, Ancho de semillas por línea. G, Razón Longitud/Ancho de semillas por línea. H, Circularidad de semillas por línea. En cada caso, los datos presentados corresponden al valor promedio por línea experimental analizada. Por cada línea experimental, más de 150 semillas fueron utilizadas para los análisis fenotípicos y estadísticos ($n > 150$). Las diferencias significativas encontradas se muestran con letras sobre las barras de cada gráfico. Las diferencias presentadas fueron calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía y post-test de Tukey ($p < 0,05$).

El estudio morfológico de las semillas basado en el análisis de fotografías de las mismas, seguido de un análisis de componentes principales, en el que se identificó que todos los parámetros analizados aportan de manera significativa a la variabilidad observada en las semillas (Anexo 1), revela que las líneas L15 A, L16 D y L1 presentan una razón longitud/ancho significativamente mayor que las plantas silvestres (Figura 14 - G). Además de lo anterior, el parámetro de circularidad (que actúa como indicador de la forma de las semillas, Anexo 2), es significativamente menor en las líneas antes mencionadas (L15 A, L16 D, L1, Figura 14 - H), en comparación con las plantas silvestres. Por otro lado, al evaluar el ancho de las semillas, se observa que a excepción de la línea L6 C, todas las líneas transformadas son significativamente más delgadas que las de la planta silvestre. De manera preliminar, este análisis morfológico de las semillas permite concluir que las semillas que provienen de plantas que expresan el gen *VviAGL11* producen semillas más largas que anchas.

Finalmente, la medición de la masa y del número de semillas reveló que no existen diferencias significativas entre las semillas provenientes de las distintas líneas transformadas, en comparación con la planta silvestre, aun cuando en el caso del

número de semillas, dos de ellas (L15 A y L2) presentan un número significativamente menor.

3.3.3 Análisis de expresión de *SlyAGL11* y *VviAGL11* durante el desarrollo floral mediante RT-PCR semi-cuantitativo.

Dado que no se pudo establecer una correlación preliminar entre los niveles de acumulación de transcritos en hojas y los diversos grados de alteración en el fenotipo de las estructuras florales o de tamaño de las semillas o frutos, se realizó un análisis semi-cuantitativo preliminar con el propósito de definir estados y líneas a analizar en profundidad. Cuatro estados de desarrollo floral, definidos por Mazzucato y col. (1998), fueron seleccionados para analizar la expresión de los genes *SlyAGL11* y *VviAGL11* (Sección 2.3.14.3, Figura 4). Los primeros tres estados elegidos (0, 1 y 2) corresponden a estados pre-antesis, seleccionados para su análisis bajo el supuesto de que la expresión del gen *VviAGL11* de vid en estados de desarrollo en los que el gen endógeno *SlyAGL11* no se expresa o su expresión es baja, podría tener efecto sobre el desarrollo de los órganos florales. El cuarto estado escogido (Estado 4) corresponde a 8dpa, seleccionado en función de los resultados obtenidos por Ocarez y Mejía. en 2015, donde se muestra que *SlyAGL11* tiene un pico de expresión.

A partir de cDNA de los estados 0, 1, 2 y 4 se realizó un RT-PCR semi-cuantitativo para determinar de manera preliminar aquellos estados del desarrollo floral donde existieran variaciones importantes de los niveles de expresión tanto de *VviAGL11* como de *SlyAGL11* entre las distintas líneas seleccionadas.

Los resultados obtenidos del análisis por RT-PCR semi-cuantitativo se muestran en las Figuras 15 y 16:

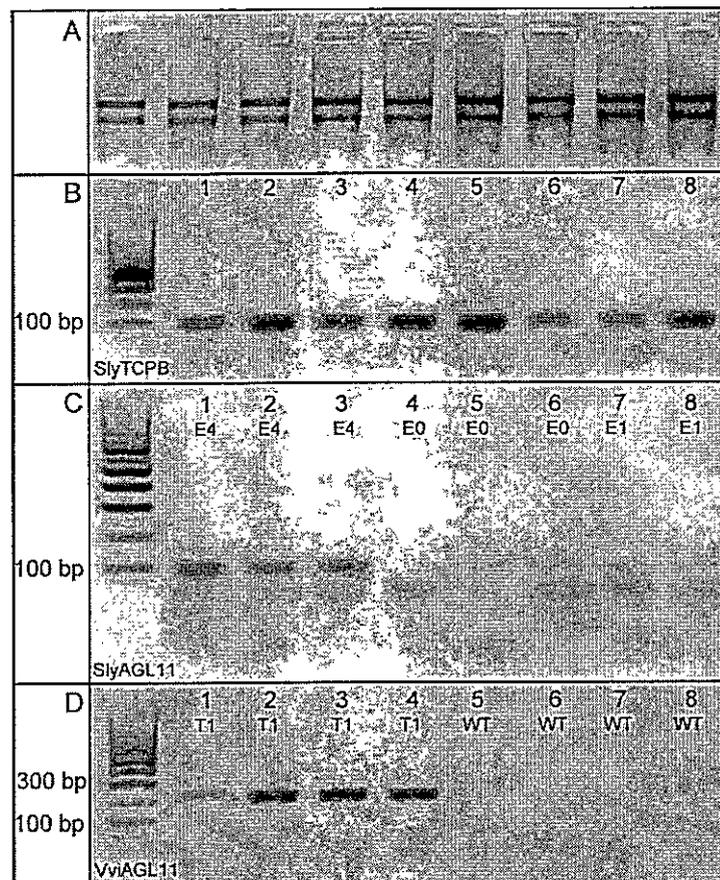


Figura 15:RT-PCR semi-cuantitativo en distintos estados del desarrollo floral de *Solanum lycopersicum*. A: Muestra representativa de la extracción de RNA desde muestras de flores y frutos en los estados de desarrollo 0, 1, 2 y 4, de un total de 120 muestras. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel denaturante de agarosa al 1,5%. La corrida electroforética fue realizada en amortiguador MOPS 1X a 80 V, durante 45 min. **B-D:** Muestras representativas de los resultados obtenidos a partir de RT-PCR desde cDNA de muestras de los estados 0, 1, 2 y 4, de un total de 120 muestras.**B,** Fragmento de 120 bp correspondiente al gen *SlyTCPB*.**C:** Fragmento de 100 bp correspondiente al gen *SlyAGL11*. En los carriles 1 al 8 se muestran amplificadores correspondientes a distintos estados de desarrollo,

destacándose las variaciones en la expresión entre ellos. **D:** Fragmento de 270 bp correspondiente al gen *VviAGL11*. En los carriles 1 al 8 se muestran amplificadores obtenidos a partir de muestras de las líneas transgénicas y a partir de las plantas silvestres, destacándose que no existe expresión de *VviAGL11* en las plantas silvestres. Los resultados obtenidos en B, C y D fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Cada corrida electroforética fue realizada en amortiguador TAE 1X a 110 V, en un período de tiempo entre 25 a 35 min.

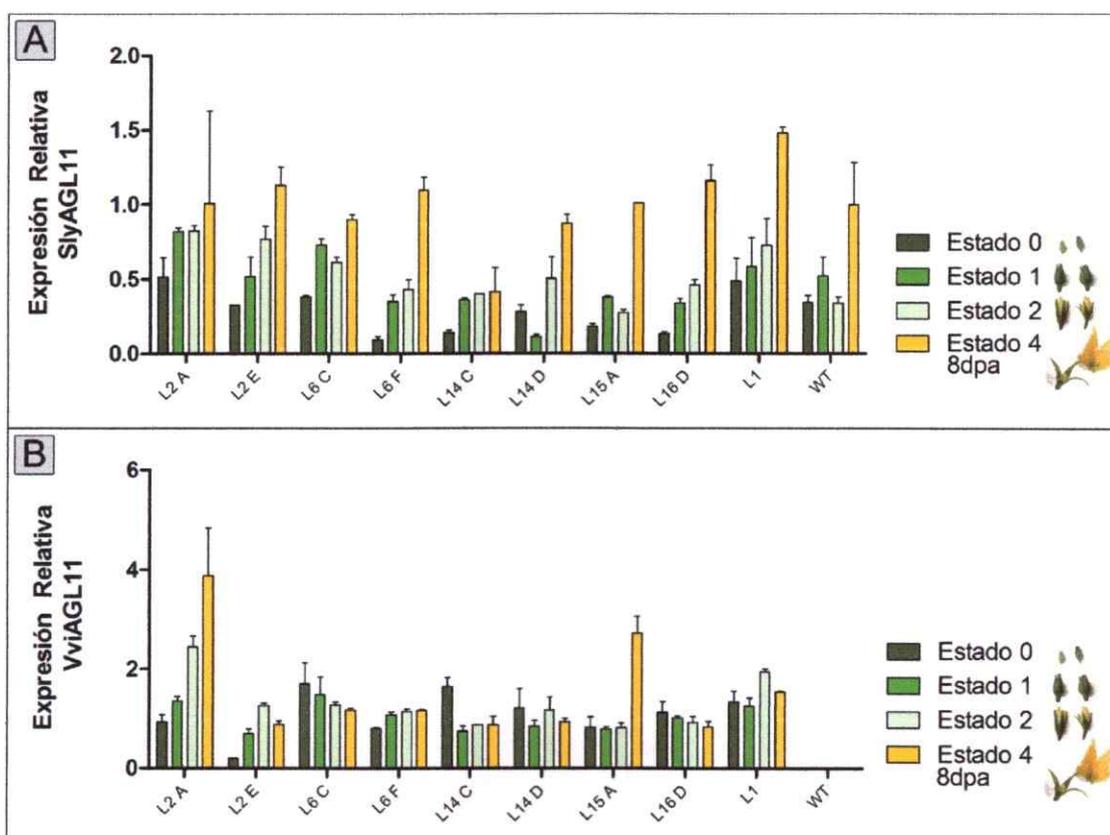


Figura 16: Análisis de expresión relativa de *VviAGL11* y *SlyAGL11* en los estados 0 a 4. **A, Análisis de expresión relativa de *SlyAGL11* normalizada contra *SlyTCPB*. **B**, Análisis de expresión relativa de *VviAGL11* normalizada contra *SlyTCPB*. La expresión relativa de los genes estudiados fue determinada mediante el análisis de la intensidad de la banda obtenida por electroforesis en gel de agarosa, utilizando el programa ImageJ. El análisis se realizó, por cada línea, en los 4 estados de desarrollo seleccionados, en triplicado biológico, en un total de 120**

muestras.

Los resultados obtenidos para el análisis de *SlyAGL11* muestran que la expresión del gen aumenta de manera relativamente progresiva desde el estado 0 hasta el estado 4. En el estado 0, se observa una baja expresión en la gran mayoría de las líneas analizadas, en comparación con el resto de los estados. Los estados 1 y 2 muestran expresiones variables entre las líneas y relativamente constantes entre sí. En el estado 4, se observa un aumento de la expresión del gen en todas las líneas analizadas, en concordancia con los resultados obtenidos por Ocares y Mejía en 2015 .

A pesar de estar bajo control del promotor fuerte CaMV 35S, *VviAGL11* muestra que existe una expresión diferencial entre los estados 0 y 4 de las líneas L2 A, L2 E, L14 C y L15 A. Por otro lado, no se detectó expresión diferencial entre los estados 1 y 2 de las líneas mencionadas, ni entre los 4 estados en el resto de las líneas seleccionadas. Estos resultados permitieron definir los estados de desarrollo 0 y 4 para el análisis de expresión de los genes *SlyAGL11* y *VviAGL11* mediante ensayos de PCR cuantitativo.

3.3.4 Análisis de expresión de *SlyAGL11* y *VviAGL11* durante el desarrollo floral mediante RT-qPCR.

Los estados de desarrollo seleccionados por RT-PCR semi-cuantitativo (estado 0 y estado 4) fueron analizados por RT-qPCR para evaluar los niveles de expresión de los genes *SlyAGL11* y *VviAGL11*. Los resultados obtenidos para el análisis de expresión de los genes de interés en el estado 0 se muestran en la Figura 17:

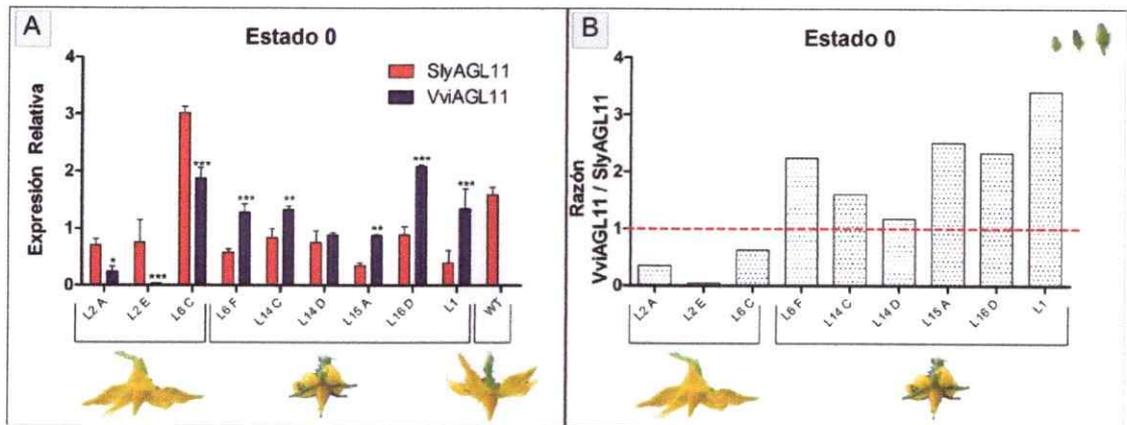


Figura 17: Expresión relativa de *SlyAGL11* y *VviAGL11* en el estado 0 de desarrollo floral. **A**, niveles de expresión relativa de *SlyAGL11* y *VviAGL11* normalizadas contra *SlySAND*. **B**, razón de expresión relativa entre *VviAGL11* y *SlyAGL11*. Para cada línea analizada se muestra, además, el fenotipo de las flores en las líneas analizadas. La expresión diferencial significativa entre *VviAGL11* y *SlyAGL11* se muestran con (*, **, ***) con un nivel de confianza de 95%, 99% y 99.9% respectivamente. Estas diferencias fueron calculadas mediante el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con post test de Bonferroni.

Los resultados del análisis en el estado 0 de desarrollo floral muestran que aquellas líneas que poseen un nivel de expresión relativa del gen *VviAGL11* mayor al nivel de expresión relativa del gen endógeno *SlyAGL11* presentan alteraciones morfológicas en el desarrollo de sus órganos florales, mientras que aquellas líneas que poseen un nivel de expresión relativa de *VviAGL11* menor al nivel de expresión relativa de *SlyAGL11*, presentan fenotipo de flores similar al de las flores de plantas silvestres (Figura 14 – A). Aquellas líneas en las que la razón *VviAGL11/SlyAGL11* es mayor que 1 (L6 F, L14 C, L14 D, L15 A, L16 D, L1) presentan alteraciones morfológicas en el desarrollo de sus órganos florales, mientras que en aquellas líneas cuya razón es menor que 1 (L2 A, L2 E, L6 C) presentan un fenotipo de flores similar al silvestre.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de los niveles de expresión de *VviAGL11* y *SlyAGL11* en el estado 4 de desarrollo floral se muestran en la Figura 18:

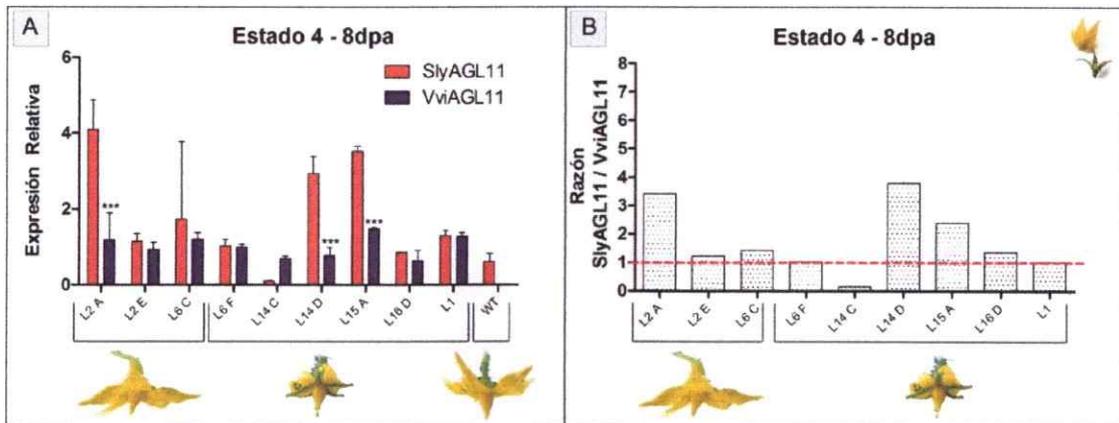


Figura 18: Expresión relativa de *SlyAGL11* y *VviAGL11* en el estado 4 de desarrollo floral. **A**, niveles de expresión relativa de *SlyAGL11* y *VviAGL11* normalizadas contra *SlySAND*. **B**, razón de expresión relativa entre *VviAGL11* y *SlyAGL11*. En cada caso se muestra, además, el fenotipo de las flores en las líneas analizadas. La expresión diferencial significativa entre *VviAGL11* y *SlyAGL11* se muestran con (*) con un intervalo de confianza de 95%, (**) con un intervalo de confianza de 99% y (***) con un intervalo de confianza de 99.9%. Estas diferencias fueron calculadas mediante el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con post test de Bonferroni.

El primer resultado que destaca del análisis de expresión a los 8 dpa es que los niveles de expresión del gen endógeno *SlyAGL11* son altamente variables entre las líneas y en comparación con la línea silvestre. Por otro lado, se puede apreciar que en la mayoría de los casos se presentan dos tendencias con respecto a la expresión de *SlyAGL11*. La primera, muestra que en algunas líneas (L2 A, L14 D, L15 A, Figura 18 – A) la expresión de *SlyAGL11* es significativamente mayor en relación con la expresión de *VviAGL11*. La segunda, muestra que en algunas de las líneas analizadas (L2 E, L6

F, L16 D, L1), el nivel de expresión relativa de ambos genes es similar (Figura 18 – A). En algunas líneas la razón *SlyAGL11* / *VviAGL11* es cercana a uno, mientras que en otras se observa que la razón *SlyAGL11* / *VviAGL11* es mayor que 1, con excepción de la línea L14 C. Sin embargo, a los 8 dpa, las diferencias de expresión encontradas entre ambos genes parecen no guardar relación con el fenotipo experimental evidenciado entre las distintas líneas.

Los resultados sugieren que la expresión de *VviAGL11* tiene un mayor impacto en el estado 0, produciendo efectos sobre el desarrollo de los órganos florales en las distintas líneas experimentales analizadas.

Se puede observar que existe una relación similar entre el nivel de expresión de *VviAGL11* en el estado 0 y los cambios fenotípicos observados, como en el caso de las líneas L6 F, L14 C, L1 y L16 D. Las líneas mencionadas, además de poseer alteraciones en el desarrollo de sus órganos florales, presentan semillas de menor tamaño (más delgadas) que las semillas provenientes de plantas silvestres, y a su vez presentan un nivel de expresión relativa de *VviAGL11* significativamente mayor que el nivel de expresión de *SlyAGL11* en el estado 0 de desarrollo, indicando que la expresión ectópica de *VviAGL11* altera la morfología tanto de semillas (produciendo semillas más delgadas) como del desarrollo de flores..

3.3.5 Determinación del número de copias del gen *VviAGL11* insertadas en el genoma de las líneas transgénicas analizadas.

Con el propósito de explicar los niveles de expresión detectados para *VviAGL11*

registrados en las líneas transgénicas, se determinó el número de copias de *VviAGL11* insertadas en las líneas transgénicas analizadas, de acuerdo al método de Ji y col. en 2012. El número de copias del gen de interés fue determinado a través de la construcción de una curva estándar que permite relacionar de manera lineal la razón logarítmica entre un gen conocido de copia única (en este caso particular, *LAT52*) y el gen de interés (en este caso particular, HPT, gen de resistencia a higromicina, presente en la construcción pGWB2/35S/*VviAGL11*), con la diferencia de sus respectivos ciclos de amplificación umbral (ΔC_T). Los resultados de la construcción de la curva estándar para el cálculo del número de copias se muestran en la Figura 19. Los datos obtenidos experimentalmente para la construcción de la curva se muestran en la Tabla 2.

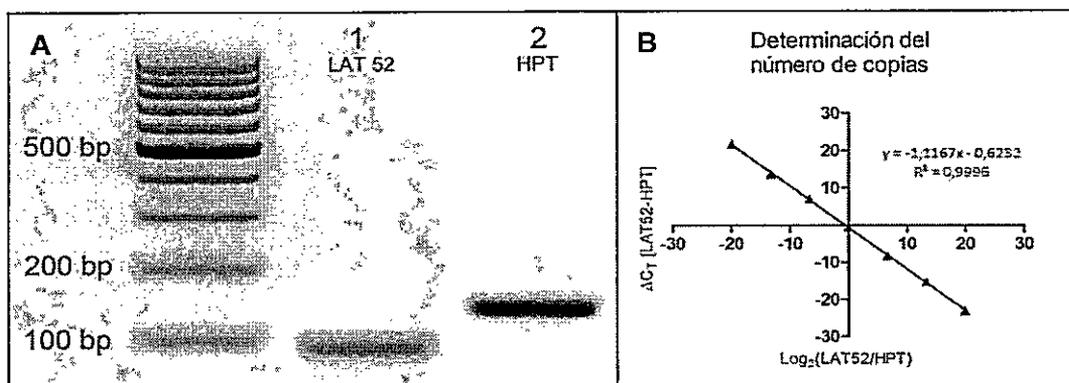


Figura 19: Construcción de curva estándar para determinación del número de copias. A, Productos de PCR correspondientes a fragmentos de los genes *LAT52* y *HPT* purificados mediante precipitación con acetato de amonio y etanol absoluto, para ser utilizados en la construcción de la curva. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Cada corrida electroforética fue realizada en amortiguador TAE 1X a 110 V, en un período de tiempo entre 25 a 35 min. B, Curva estándar obtenida, que relaciona la razón logarítmica entre el gen *LAT52* y el gen *HPT* con la diferencia entre los ciclos de amplificación umbral de cada gen estudiado (ΔC_T). Los valores obtenidos para la pendiente (-1,1167) y para el intercepto con el eje de las ordenadas (-0,6232) corresponden a los valores de α y β de las ecuaciones 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2: Datos para la construcción de curva de determinación de número de copias.

Punto	[LAT52] μM	[HPT] μM	LAT52/HPT	$\text{Log}_2(\text{LAT52}/\text{HPT})$	$\Delta\text{Ct}_{[\text{LAT52}-\text{HPT}]}$
1	0,001	0,000000001	1000000	19,93156857	-23,08255291
2	0,0001	0,00000001	10000	13,28771238	-15,13468647
3	0,00001	0,0000001	100	6,64385619	-8,277349472
4	0,000001	0,000001	1	0	-0,496202469
5	0,0000001	0,00001	0,01	-6,64385619	7,115272522
6	0,00000001	0,0001	0,0001	-13,28771238	13,71602154
7	0,000000001	0,001	0,000001	-19,93156857	21,79738426

Finalmente, el número de copias del gen HPT en cada una de las líneas transgénicas se muestran en la Tabla 3.



Tabla 3:Número de copias de gen marcador HPT en líneas transgénicas transformadas con pGWB2/35S/VviAGL11.

Línea Experimental	Número de Copias de HPT
L2 A	1 - 2
L2 E	2
L6 C	2
L6 F	2
L14 C	1
L14 D	1
L15 A	1
L16 D	1
L1	1

De acuerdo a los resultados obtenidos de la determinación del número de copias del gen *HPT* de resistencia a higromicina, se puede observar que las líneas, L2 E, L6 C y L6 F presentan dos copias integradas del gen; la línea L2 A presenta entre una y dos copias del gen, y el resto de las líneas analizadas presentan sólo una copia integrada del gen. Las líneas L2 A, L2 E y L6 C presentan un fenotipo experimental similar al de la planta silvestre, mientras que la línea L6 F presenta alteraciones morfológicas en el desarrollo de sus órganos florales.

El análisis de número de copias del transgen *VviAGL11*, inferido por el número de copias del gen marcador de selección HPT, nos permite definir dos sub-conjuntos de líneas transgénicas a comparar dentro de cada conjunto (pero no entre conjuntos). Analizando las líneas que poseen una sola copia del gen de interés, se observa una clara asociación entre los niveles de expresión de *VviAGL11*(Figuras 17 y 18) y el

grado de desarrollo de las semillas (Figura 14). Las líneas que presentan una expresión diferencial más grande L14 C y L16 D, son las mismas que presentan un desarrollo de semillas más contrastante (tomando en cuenta el área, perímetro, longitud, ancho, circularidad y la razón largo/ancho).

En conjunto, estos resultados muestran que, en líneas transgénicas que poseen una única copia de *VviAGL11*, La expresión de éste altera el desarrollo de las semillas está. Por otro lado, todas las líneas con una copia única del transgen *VviAGL11* presentan algún grado de alteración en la estructura de los órganos florales, sin llegar a cambiar la determinación de la identidad de los órganos florales involucrados.

4. DISCUSION Y PROYECCIONES

4.1 Evaluación de los niveles de expresión de *SlyAGL11* y *VviAGL11* en distintas etapas del desarrollo floral

Con el propósito de evaluar si la presencia de *VviAGL11* de *Vitis vinifera* es suficiente para producir óvulos o semillas, alteraciones en su desarrollo; o cambios en la identidad de los órganos florales, el desarrollo de este trabajo abordó la caracterización funcional del gen *VviAGL11* a través de la transformación genética de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom y la evaluación morfológica de las líneas obtenidas.

En primera instancia, se evaluaron los efectos de la expresión del gen *VviAGL11* bajo control del promotor fuerte CaMV 35S en plantas de *Solanum lycopersicum*. Del total de líneas transformadas analizadas, seis de ellas presentan fenotipo experimental distinto al de la planta silvestre en sus órganos florales. Cinco de estas 6 líneas presentan además una copia única del transgen insertada en su genoma. Las tres restantes no presentan diferencias fenotípicas apreciables en comparación con la planta silvestre. El análisis de expresión de *VviAGL11* en etapas tempranas del desarrollo floral (Estado 0) reveló que en todas las líneas donde el fenotipo experimental difiere del fenotipo de la planta silvestre, el nivel de expresión relativa de *VviAGL11* es mayor que el nivel de expresión relativa del gen endógeno *SlyAGL11*. En contraste, aquellas líneas que poseen fenotipo experimental similar al de las plantas silvestres en sus órganos florales, poseen un nivel de expresión de

VviAGL11 significativamente menor que el nivel de expresión de *SlyAGL11*. El mismo análisis de expresión, realizado en el estado 4 de desarrollo floral (8 dpa), reveló que en 8 de las nueve líneas analizadas la expresión de *SlyAGL11* es significativamente mayor que la expresión de *VviAGL11*. En la línea particular (L14 C) que mantiene los niveles de expresión de *VviAGL11* por sobre los niveles de expresión de *SlyAGL11*, no se observan diferencias importantes en su fenotipo en comparación con las demás líneas transformadas. El fenotipo experimental de las líneas transformadas muestra alteraciones en el desarrollo de inflorescencias y órganos reproductivos. En algunas líneas (L1, L15 A, L6 F), las inflorescencias desarrollan estructuras foliáceas que normalmente no se encuentran en las plantas silvestres (Figura 10, B – D). Un efecto similar fue observado en plantas de *Solanum lycopersicum* Mill. en las que *TM29*, un factor transcripcional de la familia MADS-box ortólogo al gen *SEP* (*SEPALLATA*) de *Arabidopsis thaliana*, fue silenciado (Ampomah-Dwamena y col., 2002). Además, algunas de las líneas con *TM29* silenciado presentaron tallos ectópicos con generaciones sucesivas de flores ectópicas, de manera similar a lo ocurrido en algunas de las líneas transformadas con pGWB2/35S/*VviAGL11* (Figura 11). En contraste con lo anterior, estudios en *Fragaria X ananassa* Duch. (Seymour y col., 2010) revelan que la supresión de la función de genes tipo *SEPALLATA* produce frutos aberrantes similares a los encontrados en algunas líneas transformadas con pGWB2/35S/*VviAGL11*, donde se observó desarrollo simultáneo de bayas y pétalos. Los efectos fenotípicos evidenciados podrían deberse a que en algunas de las líneas transgénicas transformadas la función *SEPALLATA* de los genes de Clase E presentes en *Solanum*

lycopersicum se ve afectada por la expresión ectópica de *VviAGL11*.

4.2 Evaluación fenotípica de órganos florales en líneas que expresan *VviAGL11* bajo control del promotor CaMV 35S

De acuerdo a los resultados obtenidos, algunas de las líneas transformadas presentan alteraciones en la morfología de sus órganos florales a nivel de sépalos, pétalos y carpelos, encontrándose sépalos engrosados, pétalos enroscados, carpelos sobre-desarrollados desde etapas tempranas del desarrollo, además de algunos frutos con fenotipo aberrante que presentan desarrollo simultáneo de pétalos y bayas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Pnueli y col. (1994), y por Pan y col. (2010), donde se encuentran alteraciones fenotípicas como engrosamiento de sépalos, enroscamiento de estructuras, frutos aberrantes con desarrollo simultáneo de bayas y pétalos, entre otras. En ambos casos, las líneas transgénicas de tomate estudiadas poseían la función de genes tipo *AGAMOUS* (*AG*) suprimida. De igual forma que con la función de los genes de Clase E tipo *SEPALLATA* (que se manifiesta a través de la interacción entre los factores transcripcionales *SEP* y *STK*), la función de los genes de Clase C tipo *AGAMOUS* podría verse afectada por la expresión ectópica de *VviAGL11*, siendo éste el único gen de Clase D presente en el contexto experimental dado.

Trabajos realizados a través del sistema de doble y triple híbrido utilizando *Saccharomyces cerevisiae* demostraron que existe interacción entre las proteínas *SEP3*, *STK* y *AG* (*SEPALLATA*, *SEEDSTICK* [Ortólogo de *VviAGL11*] y *AGAMOUS*) de *Arabidopsis thaliana* (Favaro y col., 2003); sin embargo, para que esta interacción

ocurra en la planta, las proteínas deben co-existir dentro de la misma célula y en la misma etapa de desarrollo (Immink y col., 2009). De acuerdo al modelo de los cuartetos florales propuesto por Theissen y col. (2001), la especificación de los órganos florales viene dada por la interacción entre las distintas proteínas producidas por la expresión de los genes del modelo ABCDE de desarrollo floral. Estas proteínas son en su mayoría de la familia de factores transcripcionales MADS-box MIKC^C de factores transcripcionales. El modelo propone que dichas proteínas interactúan entre ellas formando dímeros que se unen a secuencias específicas de DNA (en particular, a las secuencias conservadas de tipo CArG (Gramzow y Theissen, 2010), que posteriormente se asocian con otro dímero de proteínas unido a DNA, formando los cuartetos florales, que finalmente activarán o inhibirán la expresión de diversos genes involucrados en el proceso de desarrollo. Diferentes combinaciones de estas proteínas en los diversos tejidos y en etapas de desarrollo puntuales dan origen a los distintos órganos florales, como por ejemplo, la unión de dos heterodímeros de *AGAMOUS* y *SEPALLATA* definen la especificación del carpelo en *Arabidopsis thaliana*. (Honma y Goto., 2001).

Los antecedentes presentados sugieren que las modificaciones fenotípicas observadas en el desarrollo de los órganos florales en las líneas de *Solanum lycopersicum* transformadas, podrían deberse principalmente a la expresión de *VviAGL11*, en principio, en etapas tempranas del desarrollo floral en las que normalmente su expresión es baja (Ocares y Mejía, 2015) y, por otro lado, en tejidos donde en condiciones normales no hay expresión (Busi y col., 2003; Hileman y col.,

2006). Como una posible explicación al efecto que produce la presencia de *VviAGL11* en los distintos contextos mencionados, se propone que el factor transcripcional *VviAGL11* interactúa con otras proteínas de la familia MADS-box interviniendo su función en la determinación de la identidad de los órganos florales, en particular, alterando la función de genes de Clase C como *AGAMOUS* y en la función de genes de Clase E como *SEPALLATA*.

Trabajos realizados en *Arabidopsis thaliana* (Ditta y col., 2004) muestran que en la determinación de la identidad de los sépalos participan cuatro genes Clase E de tipo *SEPALLATA* (*SEP1*, *SEP2*, *SEP3* y *SEP4*), demostrando que la especificación de los órganos florales depende no de uno sino de varios genes distintos de cada clase. Dentro del mismo estudio, se demuestra además que la pérdida total de la identidad de los sépalos se presenta únicamente cuando se estudia la cuádruple mutante *sep1 sep2 sep3 sep4*, mientras que plantas triple mutantes, como por ejemplo la mutante *sep1 sep2 sep3*, presentan pocas alteraciones morfológicas. En el caso de la triple mutante *sep1 sep2 sep3/+*, las flores desarrolladas son fértiles y presentan diferencias con la planta silvestre únicamente a nivel del número de estambre. De igual manera, la mutante *sep1 sep2 sep4* no muestra perturbaciones significativas en el desarrollo de los órganos florales. Estos antecedentes sugieren que la alteración de la función de uno de los genes involucrados puede no ser determinante en la especificación de la identidad del órgano floral, mostrando que existe redundancia en la función de los genes pertenecientes al mismo clado filogenético (Pinyopich y col., 2003). Hileman y col. (2006), reportaron que existen a lo menos cinco genes MADS-box MIKC^C de Clase

E de tipo *SEPALLATA* (*TM5*, *TM29*, *MADS-RIN*, *MADS1*, *SIMB21*) y más de un gen Clase C de tipo *AGAMOUS* (*TAG1*, *TAGL1*, *SIMBP3*, entre otros) en *Solanum lycopersicum*. Los distintos tipos de genes pertenecientes a la misma clase pueden tener funciones específicas en la determinación de la identidad de los órganos florales (Malcomber y Kellogg, 2005). En *Arabidopsis thaliana*, los distintos genes de tipo *SEPALLATA* interactúan de manera diferencial con otros genes de la familia MADS-box en los distintos tejidos (Malcomber y Kellogg, 2005). *STK*, ortólogo a *VviAGL11*, interactúa con las proteínas *SEP1* y *SEP3* en la determinación de la identidad del óvulo, pero no interactúa con las proteínas *SEP2* y *SEP4*. *SEP1* y *SEP3* participan además en la determinación de la identidad de pétalos y estambres, donde no se ha reportado la participación de *STK* (Malcomber y Kellogg, 2005).

Trabajos realizados en *Nicotiana tabacum* (Boss y col. 2001) muestran que expresión ectópica de *VvMADS1* (gen de Clase C tipo *AGAMOUS*) involucrado en el desarrollo floral puede gatillar el desarrollo de estructuras carpeloides en lugar de sépalos, sin embargo, la expresión ectópica de *VvMADS1* en *Vitis vinifera* (Boss y col., 2003) presenta sépalos sobre-desarrollados en lugar de estructuras carpeloides. En estudios realizados en *Petunia hybrida* en los que se expresa *FBP11* (homólogo a *VviAGL11*) bajo control del promotor fuerte CaMV 35S, se obtienen fenotipos experimentales similares a los obtenidos en las líneas de *Solanum lycopersicum* transformadas, mostrando carpelos sobre-desarrollados y alteraciones en la morfología de los sépalos en algunas líneas transgénicas (Colombo y col., 1995). Sin embargo, además de éstas alteraciones fenotípicas, se observa el desarrollo de óvulos ectópicos

sobre los sépalos, fenómeno que no ocurre en las líneas transformadas de *Solanum lycopersicum*. De manera similar a lo ocurrido en *Nicotiana tabacum* y *Petunia hybrida*, la expresión ectópica de *STK* en *Arabidopsis thaliana* (Favaro y col., 2003) muestra desarrollo de óvulos ectópicos, sin embargo, el desarrollo de estructuras similares no fue evidenciado en las plantas de *Solanum lycopersicum* que expresan *VviAGL11* bajo control del promotor fuerte CaMV 35S, en contraste con lo ocurrido con la expresión ectópica de *VvMADS1* en *Vitis vinifera*, sugiriendo que la función de los distintos genes MADS-box podría haberse diversificado entre plantas con fruto carnoso y plantas con fruto dehiscente.

Estos antecedentes sugieren que los efectos fenotípicos observados en las plantas de *Solanum lycopersicum* (cv. Micro-Tom) que expresan ectópicamente *VviAGL11*, en general no afectarían la viabilidad ni la fertilidad de flores y frutos pero sí podrían afectar la función de algunos genes de Clase E o de Clase C pertenecientes a cada grupo, al intervenir en la formación de cuartetos florales específicos para la determinación de la identidad de cada órgano floral en los distintos tejidos (Figura 20) y, de esta manera, afectar la activación o la inhibición de la expresión de otros genes involucrados en el desarrollo floral (Favaro y col, 2003).

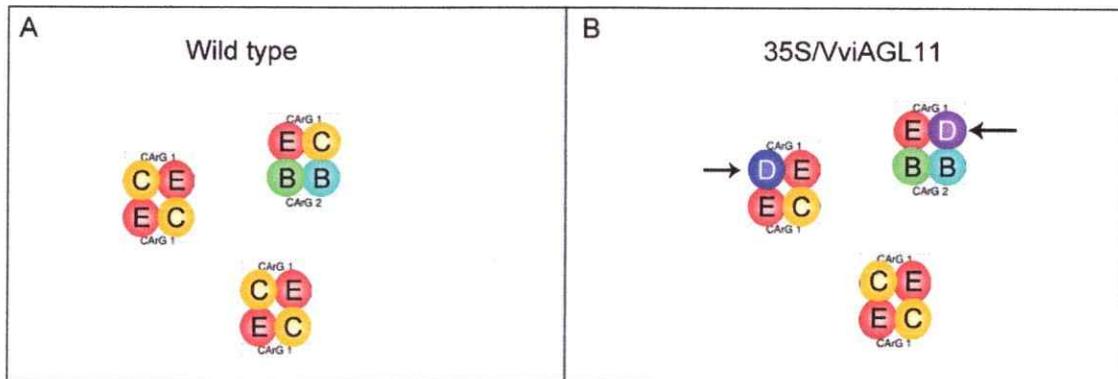


Figura 20: Efecto de la expresión ectópica de *VviAGL11* sobre la formación de cuartetos florales de factores transcripcionales MADS-box involucrados en el desarrollo floral. **A**, Formación de cuartetos florales en plantas silvestres. **B**, formación de cuartetos florales en líneas de *Solanum lycopersicum* transformadas, alterada por la presencia de *VviAGL11*. Se propone que la intervención de *VviAGL11* (de Clase D) en la formación de los cuartetos florales afecta la interacción normal de genes Clase C y Clase E, en consecuencia influyendo en la activación o inhibición de la actividad de otros genes involucrados en el desarrollo floral.

4.3 Evaluación fenotípica de semillas en las líneas que expresan *VviAGL11* bajo control del promotor CaMV 35S

Algunas de las líneas de *Solanum lycopersicum* transformadas con pGWB2/35S/*VviAGL11* presentan diferencias morfológicas en sus semillas con respecto a la planta silvestre, encontrándose que en algunas líneas (L6 F, L14 C y L16 D) las semillas son de menor tamaño que las semillas de la planta silvestre, sin embargo, su forma se mantiene similar a la de la planta silvestre. Además de ello, las líneas L6C, L15 A y L1 presentan diferencias significativas en la forma de su semilla (reflejada en su circularidad), en comparación con la planta silvestre, pero no presentan diferencias significativas en cuanto a tamaño. Además de lo anterior, 8 de las 9 líneas

evaluadas presentan semillas más delgadas que aquellas de la planta silvestre. Al analizar los niveles de expresión de *VviAGL11* de las líneas mencionadas, en el estado 0 se encontró que la gran mayoría de ellas presentan un nivel de expresión de *VviAGL11* mayor que el nivel de expresión de *SlyAGL11*, mientras que en el estado 4 los niveles de expresión de *SlyAGL11* son mayores o iguales que los niveles de expresión de *VviAGL11* en la mayoría de las líneas analizadas. *VviAGL11* es un gen de Clase D perteneciente a la familia MADS-box MIKC^c que en *Vitis vinifera* comparte la función de *STK* en la determinación de la identidad del óvulo y la semilla (Boss y col., 2002). Las alteraciones morfológicas observadas en semillas (en particular, la generación de semillas más delgadas) probablemente se debe a la acción exacerbada de *VviAGL11* en plantas transformadas de *Solanum lycopersicum* desde etapas tempranas del desarrollo, interviniendo así en el desarrollo de las semillas.

4.4 Determinación del número de copias de *VviAGL11* insertadas en el genoma de las líneas transgénicas

Por su parte, la determinación del número de copias de *HPT* integradas en las líneas transgénicas transformadas con *35S/VviAGL11* reveló que las líneas L2 E, L6 C y L6 F poseen dos copias integradas, la línea L2 A posee entre una y dos copias integradas, y que el resto de las líneas analizadas poseen sólo una copia integrada del gen de interés. El resultado de la línea L2 A (1 – 2 copias) es explicado desde el punto de vista de Zhang y col. (2015), donde los valores obtenidos en la ecuación 3 (Sección 2.3.14.5) muestran que un valor de $R = 0,5$ indica que existen exactamente dos copias del gen de interés ($N_{\text{c gen de interés}} = 2$), mientras que un valor de $R = 1$ indica que

existe una copia única del gen de interés (N_c gen de interés = 1). Cuando el valor del número de copias del gen de interés (N_c) oscila entre 1 y 2, como en el caso de la línea L2 A, donde el valor de N_c es aproximadamente 1,4, no se puede decir con certeza si se tiene una o dos copias, por lo que el número permanece incierto. Si se asume que la línea L2 A posee dos copias de *VviAGL11*, las tres líneas que presentan fenotipo de flores, frutos y semillas similares al de la planta silvestre compartirían esta característica, sugiriendo que la integración de más de una copia del gen de interés podría estar induciendo una expresión elevada del mismo, gatillando la acción de mecanismos de regulación que mantengan la expresión controlada. Sin embargo, la línea L6 F posee dos copias integradas del gen de interés, y al mismo tiempo presenta fenotipo experimental distinto al de la planta silvestre de la misma manera que el resto de las líneas analizadas, que poseen solamente una copia del gen de interés. Este fenómeno podría explicarse desde la perspectiva propuesta por Tizaoui y Kchouk en 2012, donde a partir de sus experimentos en *Nicotiana tabacum* sugiere que el número de copias puede ser independiente del número de insertos funcionales del transgen en estudio, debido a que en algunos casos podría haber, por ejemplo, copias del transgen que se insertan ligadas y que son disfuncionales, o bien debido a eventos de recombinación entre copias del transgen (Choffnes y col., 2001). En el caso de que en la línea L6 F exista sólo un inserto funcional del gen de interés de los dos que fueron integrados, se explicaría que esa línea en particular presente fenotipo experimental similar al de las demás líneas analizadas que poseen una copia única de *VviAGL11*.

Sin embargo, una dificultad importante a la hora de analizar plantas

transgénicas independientes es la diferencia en el número de copias del transgen que estén presentes, ya que más de una copia del transgen podría provocar efectos en las líneas transformadas que no reflejan necesariamente el efecto real del gen de interés. Es por esta razón que, para simplificar los análisis, Bhat y Srinivasan en 2002 sugieren que para facilitar los análisis, y para tener efectos "verdaderos" producidos por el transgen, se deberían seleccionar únicamente líneas transgénicas de copia única.

Bajo este supuesto, al analizar únicamente aquellas líneas que poseen una copia única del gen de interés es posible observar una relación entre el tamaño de las semillas de las líneas L14 C y L16D y sus niveles de expresión relativa de *VviAGL11* en el estado 0 de desarrollo floral. Los datos de expresión en el estado 4 para estas líneas muestran además que la expresión de *VviAGL11* es mayor o igual que la expresión de *SlyAGL11*. Estos antecedentes sugieren que los niveles elevados de expresión de *VviAGL11* en los estados 0 y 4 inciden en el tamaño de las semillas.

Por otro lado, las líneas L15 A, L16 D y L1 presentan alteraciones en la forma de sus semillas (en términos de circularidad), en comparación con la planta silvestre. Los niveles de expresión de *VviAGL11* en el estado 0 son significativamente mayores que los niveles de expresión de *SlyAGL11*, mientras que en el estado 4 la expresión de *VviAGL11* es menor o igual que la expresión de *SlyAGL11* para las líneas mencionadas. Esto sugiere que la expresión de *VviAGL11* en estados tempranos del desarrollo floral tiene incidencia en la forma de la semilla, posiblemente a través de sus efectos en la definición de la identidad del óvulo.

Finalmente, tomando en cuenta los resultados de expresión en el estado 4 y los

resultados de la caracterización fenotípica de semillas para las líneas L14 C, L15 A y L16 D, se puede observar que *VviAGL11* incide de manera directa en el tamaño de la semilla, puesto que en la línea L14 C, donde el nivel de expresión de *VviAGL11* en el estado 4 es mayor que el nivel de expresión de *SlyAGL11*, se observan semillas más pequeñas en comparación con la planta silvestre. Por su parte la línea L15 A, que posee un nivel de expresión de *VviAGL11* menor que el nivel de expresión de *SlyAGL11* en el estado 4, presenta semillas de un tamaño similar al encontrado en las semillas de la planta silvestre. Finalmente, para la línea L16 D se observa que en estado 4 la expresión de *VviAGL11* es muy similar a la expresión de *SlyAGL11*, y al comparar los niveles de expresión con el efecto fenotípico sobre sus semillas, se observa que las semillas de esta línea siempre son más pequeñas que aquellas de la planta silvestre, además de ser distintas a nivel morfológico.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, la expresión ectópica de *VviAGL11* produce alteraciones en la morfología de algunos órganos florales, como el engrosamiento de los sépalos, el enroscamiento de los pétalos, entre otras, sin embargo, no se producen cambios en la identidad de los órganos florales, como en la mayoría de los casos en los que se expresan genes de la familia MADS-box de manera ectópica. Las alteraciones observadas pueden deberse a que la interacción de *VviAGL11* con otros factores transcripcionales de la familia MADS-box interrumpe la función normal de éstos

Además de lo anterior, la expresión ectópica de *VviAGL11* en tomate produce alteraciones a nivel morfológico en las semillas pertenecientes a algunas de las líneas transformadas (L2 A, L2 E, L6 F, L14 C, L14 D, L15 A, L16 D, L1), reflejadas principalmente en el ancho de éstas. Además de ello, produce alteraciones de tamaño y forma en tres de las nueve líneas analizadas (L15 A, L16 D, L1), que se sustentan con los resultados obtenidos de los análisis de expresión en el estado 0, validando que *VviAGL11* posee un rol determinante en el desarrollo de las semillas, sin embargo, no es suficiente por sí solo para producir óvulos ni semillas.

En base a los resultados del análisis de expresión de *VviAGL11* y de *SlyAGL11* en distintas etapas del desarrollo floral, se observó que en todas las líneas experimentales en las que hubo alteraciones fenotípicas en sus órganos florales, éstas fueron evidenciadas desde etapas tempranas del desarrollo. Estos antecedentes

permiten concluir que la especificación de la identidad de los órganos florales es definida desde el inicio del desarrollo floral. Finalmente, la evaluación de los resultados obtenidos permite concluir que *VviAGL11* incide de manera directa en el desarrollo de las semillas, y además, en el contexto experimental estudiado, en la regulación de los órganos florales, validando finalmente su funcionalidad en el proceso de desarrollo floral.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abu-Zahra, TR.** 2010. Berry size of Thompson Seedless as influenced by the application of gibberellic acid and cane girdling. *Pakistan Journal of Botany. Rev.* 42: 1755 - 1760
- Ampomah-Dwamena, C., Morris, BA., Sutherland, P., Veit, B., Yao, JL.** 2002. Down-regulation of TM29, a tomato SEPALLATA homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiology. Rev.* 130: 605 - 617
- Angenent, G. y Colombo, L.** 1996. Molecular control of ovule development. *Trends in plant science. Rev.* 1: 228 - 232.
- Bemer, M., Hejmans, K., Airoidi, C., Davies, B., Angenent, G.** 2010. An atlas of Type I MADS Box gene expression during female gametophyte and seed development in Arabidopsis. *Plant Physiology. Rev.* 154: 287 - 300.
- Bhat, SR., Srinivasan, S.** 2002. Molecular and genetic analyses of transgenic plants: Considerations and approaches. *Plant Science. Rev.* 163: 673 - 681
- Boss, PK., Vivier, M., Matsumoto, S., Dry, IB., Thomas, MR.** 2001. A cDNA from grapevine (*Vitis vinifera* L.), which shows homology to AGAMOUS and SHATTERPROOF, is not only expressed in flowers but also throughout berry development. *Plant Molecular Biology. Rev.* 45: 541 - 553.
- Boss, PK., Sensi, E., Hua, C., Davies, C., Thomas, M.** 2002. Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Science. Rev.* 162: 887 - 895.
- Boss, PK., Buckeridge, E., Poole, A., Thomas, MR.** 2003. New insights into grapevine flowering. *Functional Plant Biology. Rev.* 30: 593 - 606
- Bowman, J., Smyth, D. y Meyerowitz, E.** 2012. The ABC model of flower development: then and now. *Development. Rev.* 139: 4095 - 4098.
- Busi, MV., Bustamante, C., D'Angelo, C., Hidalgo-Cuevas, M., Boggio, S., Valle, EM., Zabaleta, E.** 2003. MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Molecular Biology* 52: 801 - 815
- Cabezas, J., Cervera, M., Ruiz-García, L., Carreño, J., Martínez-Zapater, JM.** 2006. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome. Rev.* 49: 1572 - 1585.
- Casanova, L., Casanova, R., Moret, A., Agustí, M.** 2009. The application of gibberellic acid

- increases berry size of 'Emperatriz' seedless grape. Spanish Journal of Agricultural Research. Rev. 7: 919 - 927
- Choffnes, DS., Philip, R., Vodkin, LO.** 2001. A transgenic locus in soybean exhibits a high level of recombination. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. Rev. 37: 756 - 762
- Coen, E. y Meyerowitz, M.** 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*. Rev. 353:31 - 37.
- Colombo, L., Franken, J., Koetje, E., Van Went, J., Dons, H., Angenent, G., Van Tunen, AJ.** 1995. The Petunia MADS Box Gene FBP11 Determines Ovule Identity- *The Plant Cell*. Rev. 7: 1859 - 1868
- Coombe, DE.** 1960. An analysis of the growth of *Trema guineensis*. *Journal of Ecology*. Rev. 48: 219-231
- Coombe, BG.** 1976. The Development of Fleshy Fruits. *Annual Review of Plant Physiology*. Rev. 27: 207 - 228.
- Costantini, L., Battilana, J., Lamaj, F., Fanizza, G., Grando, MS.** 2008 Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): From Quantitative trait loci to underlying genes. *BMC Plant Biology*. Rev. 8:38.
- De Bodt, S., Raes, J., Florquin, K., Rombauts, S., Rouzé, P., Theissen, G., Van de Peer, Y.** 2003. Genomewide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants. *Journal of Molecular Evolution*. Rev. 56: 573 - 586.
- De Folter, S., Shchennikova, A., Franken, J., Busscher, M., Baskar, R., Grossniklaus, U., Angenent, C., Immink, R.** 2006. A Bsister MADS-box gene involved in ovule and seed development in petunia and Arabidopsis. *The Plant Journal*. Rev. 47: 934 - 946.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W.** InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., Yanofsky, M.** 2004. The SEP4 Gene of *Arabidopsis thaliana* Functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology*. Rev 14: 1935-1940.
- Doligez, A., Bouquet, A., Danglot, Y., Lahogue, F., Riaz, S., Meredith, CP., Edwards, KJ., This, P.** 2002. Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theor Appl Genet*. Rev. 105: 780 - 795.
- Doligez, A., Bertrand, Y., Farnos, M., Grolier, M., Romiew, C., Esnault, F., Dias, S., Berger, G., François, P., Pons, T., Ortigosa, P., Roux, C., Houel, C., Laucou, V., Bacilieri, R., Péros,**

- JP., This, P.** 2013. New stable QTLs for berry weight do not colocalize with QTLs for seed traits in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology*. Rev 13: 217.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H., Sommer, H.** 1999. Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *The EMBO Journal*. Rev. 18: 5370 - 5379.
- Favaro, R., Pinyopich, A., Battaglia, R., Kooiker, M., Borghi, L., Ditta, G., Yanofsky, M., Kater, M., Colombo, L.** 2003. MADS-Box Protein Complexes Control Carpel and Ovule Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. Rev. 15: 2603 - 2611
- Göktürk, N., Harmankaya, N.** 2005. Changes in endogenous hormone levels during the ripening of grape cultivars having different berry set mechanisms. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. Rev. 29: 205-210
- Gramzow, L., Theissen, G.** 2010. A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome biology*. Rev. 11: 214.
- Guisheng, L., Zheng, M., Hongzhi, K., Zhiduan, C., Anming, L.** 2003. ABC model and floral evolution. *Chinese Science Bulletin*. Rev. 48: 2651 - 2657.
- Henschel, K., Kofuji, R., Hasebe, M., Saedler, H., Munster, T., Theissen, G.** 2002. Two ancient classes of MIKC-type MADS-box Genes are present in the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Biology and Evolution*. Rev. 19: 801 - 814.
- Hileman, L., Sundstrom, J., Lit, A., Chen, M., Shumba, T., Irish, V.** 2006. Molecular and Phylogenetic Analyses of the MADS-Box Gene Family in Tomato. *Molecular Biology and Evolution*. Rev. 23: 2245 - 2258
- Honma, T., Goto, K.** 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*. Rev. 409: 525 - 529.
- Immink, R. G., Tonaco, I. A., de Folter, S., Shchennikova, A., van Dijk, A. D., Busscher-Lange, J., Borst, J., Angenent, G.** 2009. SEPALLATA3: the "glue" for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biology*. Rev. 10: R24.
- Iwahori, S., Weaver, R.J., Pool, R.M.** 1968. Gibberellinlike activity of berries and seedless 'Tokay' grapes. *Plant Physiology*. Rev. 43: 333-337
- Jeon, JS., Lee, S., Jung, KH., Yang, WS., Yi, GH., Oh, BG., An, G.** 2000. Production of transgenic rice plants showing reduced heading date and plant height by ectopic expression of rice MADS-box genes. *Molecular breeding*. Rev. 6: 581 - 592
- Ji, W., Cai, L., Wright, M.B., Walker, G., Salgam, P., Vater, A., Lindpaintner, K.** 2000.

Preservation of gene expression ratios among multiple complex cDNAs after PCR amplification: application to differential gene expression studies. *Journal of Structural and Functional Genomics*. Rev. 1: 1 - 7

Ji, W., Li, J., Liu, J. 2012. A Method for Measuring Gene Copy Number in Biological Samples without Using Control Samples of Known Copies. *The Journal of Molecular Diagnostics*. Rev. 14: 280 - 285

Kaufman, K. 2005. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene*. Rev. 347: 183–198

Malcomber, S. y Kellogg, E. 2005. SEPALLATA gene diversification: brave new whorls. *Trends in plant science*. Rev. 10: 427 - 435.

Martí, E., Gisbert, C., Bishop, GJ., Dixon, MS., García-Martínez, JL. 2006. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *Journal of Experimental Botany*. Rev. 57: 2037 - 2047.

May, P. 2000. From bud to berry, with especial reference to inflorescence and bunch morphology in *Vitis vinifera* L. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. Rev. 6: 82-98.

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

Mejía, N., Gebauer, M., Muñoz, L., Hewstone, N., Muñoz, C., Hinrichsen, P. 2007. Identification of QTLs for seedlessness, berry size, and ripening date in a seedless x seedless table grape progeny. *American Journal of Enology and Viticulture*. Rev. 58: 499 - 507.

Mejía, N., Soto, B., Guerrero, M., Casanueva, X., Houel, C., Miccono, M., Ramos, R., Le Cunff, L., Bourisquot, JM., Hinrichsen, P., Adam-Blondon, A. 2011. Molecular, genetic and transcriptional evidence for a role of VvAGL11 in stenospermocarpic seedlessness in grapevine. *BMC Plant Biology*. Rev 11: 57.

Messenguy, F., Dubois, E. 2003. Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene*. Rev. 316: 1 - 21.

Nakagawa, T; Kurose, T; Hino, T; Tanaka, K; Kawamukai, M; Niwa, Y; Toyooka, K; Matsuoka, K; Jinbo, T; Kimura, T. 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation *Journal of bioscience and bioengineering*. Rev. 104: 34-41

Ocares, N., Mejía, N. 2015. Suppression of D-Class MADS-box AGL11 gene triggers

seedlessness in fleshy fruits.. *Plant Cell Reports. Rev.* 35: 239-254

Pan, I., McQuinn, R., Giovannoni, J., Irish, V. 2010. Functional diversification of AGAMOUS lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. *Journal of Experimental Botany. Rev.* 61: 1795 - 1806

Pérez, F.J., Viani, C., Retamales, J. 2000. Bioactive gibberellins in seeded and seedless grapes: identification and changes in content during berry development. *American Journal of Enology and Viticulture. Rev.* 51: 315-318.

Pfaffl, MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research. Rev.* 29: e45

Pinyopich, A., Ditta, G., Savidge, B., Liljegren, S., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M. 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature. Rev.* 424: 85 - 88.

Pluthero, FG. 1993. Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Research. Rev.* 21: 4850 - 4851

Pnueli, L., Hareven, D., Rounsley, S., Yanofsky, M., Lifschitz, E. 1994. Isolation of the Tomato AGAMOUS gene TAG1 and Analysis of its Homeotic Role in Transgenic Plants. *The Plant Cell. Rev.* 6: 163 - 173

Ramachandran, E., Bhattacharya, S., John, SA., Battacharya, PS., Abraham, G. 2011. Heterologous expression of Aspen PTM3, a MADS box gene in cotton. *Journal of Biotechnology. Rev.* 155: 140 - 146

Riechmann, JL., Meyerowitz, E. 1997. MADS domain proteins in plant development. *Biological Chemistry. Rev.* 378, 1079 - 1101.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods. Rev.* 9: 671-675.

Seymour, G., Poole, M., Manning, K., Ging, G. 2008. Genetics and epigenetics of fruit development and ripening. *Current Opinion in Plant Biology. Rev.* 11: 58 - 63

Seymour, G., Ryder, C., Cevik, V., Hammond, John., Popovich, A., King, G., Vrebalov, J., Giovannoni, J., Manning, K. 2010. A SEPALLATA gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria3ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue. *Journal of Experimental Botany. Rev.* 62: 1179 - 1188

Sun, HJ., Uchii, S., Watanabe, S., Ezura, H. 2006. A Highly Efficient Transformation Protocol for Micro-Tom, a Model Cultivar for Tomato Functional Genomics. *Plant Cell Phisiology. Rev.* 47:

426 - 431.

Tanabata, T., Shibaya, T., Hori, K., Ebana, K., Yano, M. 2012. SmartGrain: High-throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis. *Plant Physiology. Rev.* 160(4): 1871-1880

Theissen, G., Saedler, H. 2001. Plant Biology: Floral quartets. *Nature. Rev.* 409: 469 - 471.

Tizaoui, K., Kchouk, ME. 2012. Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. *Genetics and Molecular Biology. Rev.* 35: 640 - 649

Weigel, D. y Meyerowitz, E. 1994. The ABCs of floral homeotic genes. *Cell. Rev.* 78: 203 - 209

Yang, L., Pan, A., Jia, J., Ding, J., Chen, J., Cheng, H., Zhang, C., Zhang, D. 2005. Validation of a tomato-specific gene, LAT52, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes. *Journal of agricultural and food chemistry. Rev.* 53: 183 - 190

Yao, JL., Dong, YH., Morris, B. 2000. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *PNAS. Rev.* 98: 1306 - 1311

Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, J., Wang, G., Wang, J., Liu, Y. 2015. Assessment of transgene copy number and zygosity of transgenic maize overexpressing Cry1le gene with SYBR® Green qRT-PCR. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Rev.* 51: 125 - 134