



Caracterización fenotípica del desarrollo reproductivo del mutante *excessive number of floral organs (eno)* de tomate, *Solanum lycopersicum* L.

Félix Juan Martínez Rivas

Tutores: Rafael Lozano Ruiz y Fernando J. Yuste Lisbona

Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria. Universidad de Almería. Julio 2015

Sine agricultura nihil

Sin agricultura, nada

Columela, 7 d.C- 40 d.C

Resumen

En este trabajo de fin de máster se ha caracterizado a nivel fenotípico el desarrollo reproductivo del mutante *excessive number of floral organs (eno)*. Este mutante presenta un mayor número de órganos en los tres verticilos internos de la flor, en comparación con las plantas silvestres (WT), lo que se traduce en un fruto con un mayor número de lóculos. Este incremento de lóculos está acompañado de un aumento de tamaño en el diámetro meridional, así como de un aumento en el peso del fruto, lo cual se traduce en un incremento en la producción. Además, también se realizó un estudio celular de los diferentes estadios de floración, para determinar si el incremento de tamaño de las flores *eno* se debe a un aumento del tamaño celular o a un mayor número de células. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas en el número de células por mm² entre flores mutantes y WT, lo cual sugiere que *ENO* está implicado en el control del ciclo celular, regulando el número de divisiones celulares durante el desarrollo floral.

Summary

The aim of this final master project is to carry out the phenotypic characterization of the reproductive development in the tomato mutant *excessive number of floral organs (eno)*. The *eno* plants yield flowers with an increased number of floral organs in the three innermost floral whorls, which causes that *eno* plants yield greater and heavier fruits. As result, these larger fruits are responsible for an increased in the total yield of the mutant plants in comparison with the wild-type (WT) ones. Moreover, a cellular study at different stages of floral development has been carried out in order to determine if the bigger size of *eno* flowers is due to an increase in the cellular size or in

the cell number. Results displayed that the number of cell per mm² did not show significant differences between the mutant and WT flowers, which suggests that *ENO* is involved in the control of the cell cycle, regulating the number of cell division during floral development.

Índice

Resumen	2
1. Introducción.....	6
1.1. El tomate.....	6
1.1.1. Origen y domesticación.....	6
1.1.2. Taxonomía y morfología.....	6
1.1.3. Importancia económica.....	7
1.1.4. El tomate como sistema experimental para estudios de desarrollo.....	8
1.2. Desarrollo del tomate.....	8
1.2.1. Desarrollo vegetativo.....	9
1.2.2. Desarrollo reproductivo.....	10
1.3. Regulación genética del tamaño del fruto en tomate.....	11
1.4. Antecedentes y estado actual del tema objeto de estudio.....	13
2. Objetivos.....	14
3. Materiales y métodos.....	15
3.1. Material vegetal.....	15
3.2. Caracterización fenotípica.....	15
3.3. Estudios celulares.....	17
3.4. Análisis estadístico.....	18
4. Resultados y discusión.....	18
4.1. Caracterización fenotípica.....	18
4.2. Estudios celulares.....	28
6. Bibliografía.....	30

Índice de figuras

Figura 1.....	7
Figura 2.....	9
Figura 3.....	14
Figura 4.....	16
Figura 5.....	18
Figura 6.....	19
Figura 7.....	20
Figura 8.....	21
Figura 9.....	22
Figura 10.....	23
Figura 11.....	23
Figura 12.....	24
Figura 13.....	25
Figura 14.....	25

Figura 15.....	26
Figura 16.....	26
Figura 17.....	27
Figura 18.....	27
Figura 19.....	27
Figura 20.....	29

1. Introducción

1.1. El tomate

1.1.1. Origen y domesticación

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) es una especie incluida en la familia de las solanáceas. Esta familia comprende aproximadamente 10.000 especies que crecen en una gran diversidad de hábitats, desde la selva a la alta montaña pasando por el desierto. Ello ha contribuido, en gran medida, a la importante variabilidad genética presente entre las especies del grupo (Knapp, 2002). El tomate es originario de la zona de América del Sur comprendida entre el Amazonas y los Andes, concretamente de la región andina que se extiende desde el sur de Colombia al norte de Chile. Su cultivo se ha extendido por multitud de hábitats gracias a su capacidad de adaptación a distintos entornos; aunque, originariamente, la domesticación del tomate ocurrió en México, y desde allí llegó a Europa, donde se ha introducido en la dieta y gastronomía.

1.1.2. Taxonomía y morfología

La clasificación taxonómica del tomate cultivado es la siguiente: reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida (Dicotiledóneas), subclase Asteridae, orden Solanales, suborden Solanineae, familia Solanaceae, género *Solanum* y especie *S. lycopersicum* (Fooland, 2007).

El tomate es una planta perenne, de porte arbustivo cultivada como anual. Se puede desarrollar de forma rastrera, semirrecta o erecta. El sistema radicular de esta especie está constituido por una raíz principal, corta y débil, y multitud de raíces secundarias y más numerosas y potentes que la principal. En el tallo principal, de 2 a 4 cm de diámetro, se desarrollan hojas, tallos secundarios e inflorescencias. Tiene una hoja compuesta en la que se

encuentran foliolos peciolados, lobulados y de borde dentado. La flor es simétrica, regular e hipógina con 5 o más sépalos e igual número de pétalos, estos presentan un color amarillo. Los estambres quedan unidos lateralmente, formando un cono estaminal que envuelve al gineceo. El gineceo porta un óvulo bi o plurilocular (Figura 1A). Las flores se agrupan en inflorescencias y se unen al tallo por medio de un pedicelo, que contiene la zona de abscisión. Esta se distingue al ser un engrosamiento con un pequeño surco originado debido a la reducción del espesor del córtex. El fruto es una baya bi o plurilocular, constituido por el pericarpio, la placenta y las semillas (Figura 1B) (Salinas, 2006).

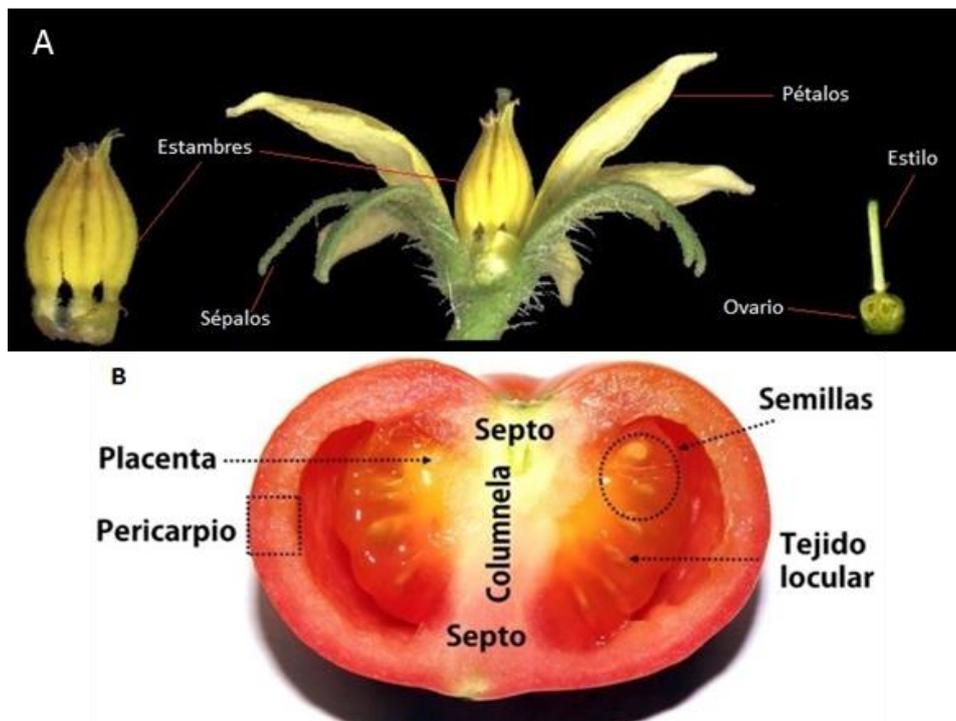


Figura 1 A, Diferentes partes de una flor de tomate.
B, Corte transversal de un fruto de tomate diferenciando sus partes.

1.1.3. Importancia económica

Hoy en día, el tomate constituye uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial, por su elevado uso tanto para consumo fresco como en productos de preparación industrial. El tomate es uno de los cultivos con mayor relevancia económica en nuestro país, siendo España el octavo productor mundial con 4 millones de toneladas y, concretamente,

Almería es responsable de un cuarto del total de la producción estatal (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2015) (Junta de Andalucía , 2015).

1.1.4. El tomate como sistema experimental para estudios de desarrollo

El tomate no sólo es uno de los productos más importantes de la agricultura intensiva sino que, además, es una de las especies cultivadas que está experimentando en los últimos años mayores avances en los ámbitos de genética, genómica y mejora. Actualmente es el sistema modelo para estudiar la biología del desarrollo de los frutos carnosos así como las interacciones planta-patógeno. Este hecho se ve favorecido por tratarse de una especie autógama y diploide ($2n=24$), con un genoma relativamente pequeño (950 Mb), codificando aproximadamente 35.000 genes (Barone, et al., 2008), un ciclo de vida corto, un elevado potencial reproductivo y se dispone de protocolos rutinarios de transformación. Todos estos factores, sumados a que su genoma ha sido recientemente secuenciado (The Tomato Genome Consortium, 2012) y a la cada vez mayor disponibilidad de herramientas genéticas y genómicas, ha propiciado numerosos avances en el estudio de procesos del desarrollo relevantes para la productividad y calidad de este cultivo.

1.2. Desarrollo del tomate

Durante el ciclo de vida de las plantas se distinguen dos tipos de desarrollo; en el primero, denominado desarrollo vegetativo, la planta genera únicamente folíolos y tallos laterales gracias a la diferenciación de las células del meristemo apical del tallo. La segunda fase, denominada fase reproductiva, se inicia gracias al control de diferentes señales endógenas y exógenas que generan un cambio en el patrón de desarrollo del meristemo apical, iniciando la formación de flores (Molinero-Rosales, et al., 1999).

1.2.1. Desarrollo vegetativo

La etapa vegetativa se puede subdividir en dos etapas, la primera comienza con la germinación de la semilla y el desarrollo de la plántula, mientras que la segunda se inicia a partir de los 21 días desde la germinación y dura entre 25 y 30 días. Durante esta segunda etapa, el meristemo apical desarrolla un primer segmento de entre 8 a 10 hojas, dependiendo del genotipo, finalizando éste con el desarrollo de una inflorescencia (Salinas, 2006).

El tomate exhibe un hábito de crecimiento simpodial, donde el meristemo apical del tallo es determinado y el desarrollo del primer brote culmina con la formación de la primera inflorescencia. A este primer brote se le denomina “segmento inicial”. A continuación, un nuevo brote vegetativo se desarrolla a partir del meristemo axilar, localizado en la axila de la hoja más joven, justo por debajo de la inflorescencia. Este meristemo, ahora denominado meristemo simpodial, permite a la planta continuar su crecimiento, desarrollando tres nudos vegetativos (hojas) antes de terminar en una nueva inflorescencia (Figura 2). Este patrón de crecimiento se repite dando lugar a nuevos segmentos determinados o “segmentos simpodiales”. Por tanto, la arquitectura del tomate implica una alternancia regular de fases vegetativas y reproductivas entre el brote primario y los brotes axilares (Atheron & Harris, 1986).

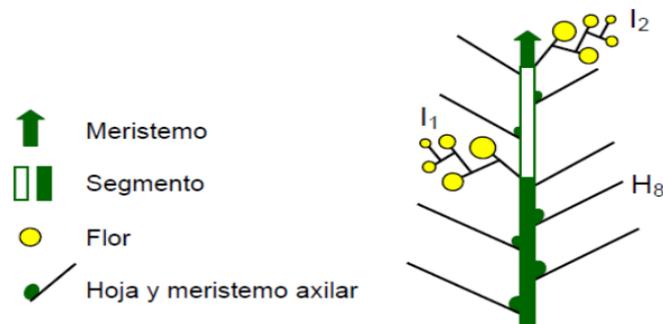


Figura 2 Representación esquemática del patrón de crecimiento simpodial en tomate. H: hoja, I: inflorescencia.

1.2.2. Desarrollo reproductivo

La transición floral en tomate, y por tanto el inicio de la fase reproductiva, implica el cambio en la identidad del meristemo apical del tallo, que pasa de ser un meristemo vegetativo a tener identidad de meristemo de inflorescencia (Weigel, 1995). Para ello, las células del meristemo apical del tallo cambian su patrón de desarrollo, dando lugar al meristemo de inflorescencia, a partir del cual se desarrolla lateralmente el meristemo floral dando lugar a la primera flor. Los sucesivos meristemos florales se desarrollan por debajo del primero, alrededor de un eje principal. El proceso culmina con la producción de una flor terminal. Generalmente, la inflorescencia determinada está compuesta por 5-10 flores (Allen & Sussex, 1996).

Tras la fertilización de los óvulos, los carpelos se transforman en un órgano complejo que da lugar a un fruto maduro. Las plantas de tomate producen frutos rojos carnosos como resultado de un proceso de desarrollo que incluye tres fases cuajado, crecimiento y maduración (Ruan, et al., 2012). La fase de cuajado se entiende como el periodo que transcurre desde la parada en el crecimiento que tiene lugar en el carpelo durante la anthesis hasta que se reanuda la división celular, es decir la transición desde el ovario a un fruto en desarrollo con capacidad para convertirse en un fruto maduro. En la segunda fase, se produce el crecimiento del fruto, primero como consecuencia de divisiones celulares y posteriormente el fruto continúa creciendo a través de la expansión celular hasta que alcanza el tamaño final. En la tercera fase, desde el comienzo de la maduración aumenta significativamente la respiración y la síntesis de etileno, características específicas de los frutos climatéricos como el del tomate. Como consecuencia, se producen cambios bioquímicos y fisiológicos que afectan al color, textura, sabor, aroma y contenido nutricional (Giovannoni, 2004).

1.3. Regulación genética del tamaño del fruto en tomate

El tamaño del fruto es uno de los caracteres de mayor interés agronómico en tomate, puesto que afecta directamente a la productividad y calidad del cultivo. Es conocido que el tamaño de fruto depende, tanto del número de carpelos que se desarrollan en el ovario (cuarto verticilo floral), como del número de divisiones celulares que acontecen durante el crecimiento del fruto; si bien es el número de carpelos en la flor y, por ende el número final de lóculos en el fruto maduro, el responsable de aumentos de tamaño de hasta el 50% (Tanksley, 2004). Ambos procesos deben estar íntimamente coordinados, y dependen esencialmente de un programa de desarrollo que se inicia en el meristemo floral.

La tasa de división celular en el meristemo floral es uno de los factores que determina el tamaño del fruto. La modificación más significativa en este aspecto es debida a una mutación en el gen *FRUIT WEIGHT 2.2 (FW2.2)* que codifica un regulador negativo del ciclo celular. (Liu, et al., 2003) La mutación responsable del aumento de tamaño causa el engrosamiento de la placenta y la columnela del fruto (Figura 1B). Además, también ha sido descrito el gen responsable del QTL *FRUIT WEIGHT 3.2 (FW3.2)*. Dicho gen codifica un citocromo P450, ortólogo del gen *KLUH* de *Arabidopsis* (Chakrabarti, et al., 2013). En tomate, una mutación en el promotor de este gen causa un aumento en el tamaño del fruto, debido a un incremento en el número de células del pericarpo y del septum (Figura 1B).

Sin embargo, es el número de carpelos que se desarrollan en la flor, los cuales establecen el número final de lóculos en el fruto, el que principalmente establece el tamaño del fruto. El incremento en el número de órganos florales viene determinado por el tamaño del meristemo floral, cuya regulación implica un bucle de retroalimentación negativo que involucra a la vía de señalización extracelular formada por los genes *CLAVATA (CLV1, CLV2 y CLV3)* y al gen *WUSCHEL (WUS)*, el cual codifica un factor de transcripción con homeodominios, necesario para mantener la actividad indiferenciada de las células

meristemáticas (Brand, et al., 2002; Clark, 2001; Lenhard & Laux, 2003; Schoof, et al., 2000). Dicha ruta de señalización extracelular está altamente conservada en plantas. De este modo, tanto en *Arabidopsis* como en tomate, mutaciones en los genes *CLAVATA* ocasionan un incremento del tamaño del meristemo floral producido por un aumento de los dominios de expresión del gen *WUS*, dando lugar a flores con un mayor número de órganos (Xu, et al., 2015).

Dos loci, *LOCULE NUMBER (LC)* y *FASCIATED (FAS)*, han sido descritos como reguladores del número de carpelos en el ovario durante la organogénesis floral, siendo *FAS* el factor determinante de los cambios evolutivos ocurridos en el tamaño del fruto durante la domesticación del tomate (Cong, et al., 2008). El locus *LC* está definido por dos SNP localizados 1080 pb corriente abajo del gen homólogo a *WUS* de *Arabidopsis* (Muños, et al., 2011). Incrementos en la expresión de *WUS* en *Arabidopsis* dan lugar a un aumento en el número de órganos en la flor, de forma similar al fenotipo mostrado por los mutantes *lc* (Mayer, et al., 1998). Respecto al gen *FAS*, aunque inicialmente se estableció que el mayor número de lóculos observado en los frutos del mutante *fas* se debía a una pérdida de función de un factor de transcripción de tipo YABBY (Cong, et al., 2008), recientemente se ha determinado que en este mutante existe una inversión de 294 kb en el cromosoma 11 que afecta al promotor del gen homólogo a *CLV3* en *Arabidopsis* (Xu, et al., 2015).

Asimismo, el meristemo floral presenta un crecimiento determinado, formando un número específico de órganos con tamaño y forma particular antes de cesar su actividad. Diferentes conjuntos de células del meristemo floral adquieren identidades específicas dependiendo de la posición que ocupan, originando un patrón verticilado de órganos florales. Este proceso, denominado determinación floral, es crítico para el desarrollo reproductivo de la planta y requiere un control preciso espacio-temporal, de los diferentes genes que regulan la actividad del meristemo (Blázquez, et al., 2006). Aunque en *Arabidopsis* la determinación floral

está regulada por la actividad de factores de transcripción codificados por los genes *AGAMOUS* (*AG*) y *WUS* (Lenhard, et al., 2001; Lohmann, et al., 2001), en tomate no se ha descrito interacción entre los genes homólogos, a saber, *TOMATO AGAMOUS1* (*TAG1*) y *SIWUS*, respectivamente. El cese de la actividad del meristemo floral de tomate está regulado por el gen *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY* (*IMA*), que codifica una proteína mini zinc finger, el cual actúa como represor del gen *SIWUS*, inhibiendo la proliferación de células meristemáticas y por consecuencia la determinación floral (Sicard, et al., 2008). De este modo, plantas en las que *IMA* ha sido silenciado desarrollan frutos de mayor tamaño debido a que sus flores muestran numerosos carpelos fusionados en el cuarto verticilo (Sicard, et al., 2008).

1.4. Antecedentes y estado actual del tema objeto de estudio

Los trabajos clásicos en el campo de la Genética clásica han demostrado que la mejor forma de inferir con claridad la función de un gen radica en la obtención y caracterización de mutantes con anulación o alteración de función. Estos han permitido identificar más de una centena de genes implicados en el desarrollo floral y del fruto de *Arabidopsis*, y de otras especies. El grupo de Genética y Fisiología del Desarrollo Vegetal (AGR-176) de la Universidad de Almería, dispone de una colección de mutantes afectados en caracteres relacionados con el desarrollo floral y del fruto. Entre ellos, el mutante *excessive number of floral organs* (*eno*) se caracteriza por presentar flores con un elevado número de órganos en cada verticilo (Figura 3A), dando lugar a frutos acostillados con un tamaño superior al mostrado por las plantas wild-type (Figura 3B); fenotipo que sigue un patrón de herencia monogénico y recesivo. Tales anomalías se originan en etapas muy tempranas del desarrollo floral, puesto que la mutación *eno* incrementa de manera significativa el tamaño del meristemo floral, que a su vez, tiene efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres reproductivos, entre los que destaca la formación de frutos de gran tamaño, multiloculares y acostillados. El fenotipo *eno* es similar al observado en el mutante *fasciated* (*fas*); no obstante el test de complementación genética reveló que el

gen *ENO* no es alélico del locus *FAS* (Fernández-Lozano et al., 2015). Asimismo, los análisis de expresión de los genes involucrados en el desarrollo floral y el tamaño del fruto indican que *ENO* es un nuevo regulador de la actividad y el tamaño del meristemo floral, función que será determinada tras la clonación del gen, actualmente en proceso.

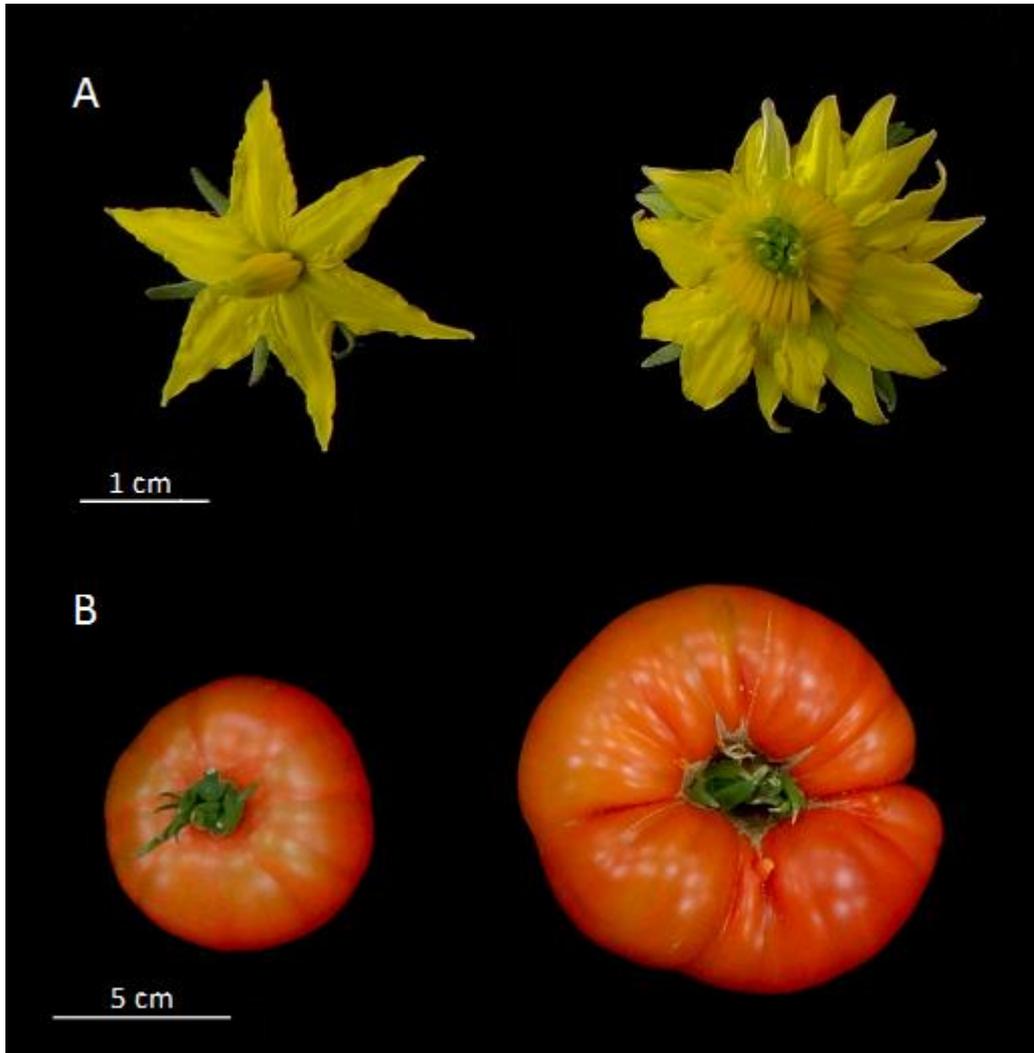


Figura 3 Flores en estadio de pre antesis (A) y frutos en estadio verde maduro (B). Se presenta el WT a la derecha y eno a la izquierda.

2. Objetivos

Con los antecedentes descritos en el apartado anterior, los objetivos concretos de este Proyecto Fin de Máster fueron los siguientes: la caracterización fenotípica de

distintos parámetros de importancia agronómica en plantas y frutos WT y *eno*. Además se realizó la determinación del número de células por área en distintos estadios del desarrollo floral. Mediante estos estudios se pretende determinar el papel de *ENO* durante el desarrollo reproductivo de tomate (*Solanum lycopersicum L.*).

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

El mutante *eno* fue identificado en un “screening” fenotípico de líneas mutantes de T-DNA obtenidas del cultivar P73 (cedidas por la Dr. M.J. Díez). El análisis molecular, realizado previamente a la elaboración de este trabajo de fin de master por los miembros del grupo AGR-176, determinó que el fenotipo del mutante *eno* no está causado por un inserto de T-DNA. De este modo, en este trabajo se han caracterizado 10 plantas de fenotipo silvestre (wild-type, WT: cv. P73) y 10 plantas T4 del mutante *eno* obtenidas por autofecundación de una planta T3 que no contenía ninguna copia del T-DNA y, sin embargo, mostraba los rasgos fenotípicos de la mutación.

Las semillas se sembraron en bandejas de polipropileno con una mezcla de turba:fibra de coco:vermiculita (2:1:1) y se mantuvieron en este medio hasta el desarrollo de la 7-8 hoja. Posteriormente, las plántulas se trasladaron a un invernadero localizado en la finca experimental de la Fundación UAL-ANECOOP, y fueron cultivadas durante la campaña otoño – invierno 2014/2015.

3.2. Caracterización fenotípica

Para cada una de las plantas evaluadas se analizaron una serie de caracteres vegetativos a saber: número de hojas hasta la primera inflorescencia y entre inflorescencias,

así como el número de tallos secundarios. Además, se cuantificó el número de flores y de frutos producidos por las cuatro primeras inflorescencias de cada planta evaluada. Conjuntamente, todos los frutos en estado de madurez comercial desarrollados por estas cuatro primeras inflorescencias fueron evaluados para los siguientes caracteres:

- **Peso:** los frutos se pesaron usando una balanza electrónica KERN 440 – 49A.
- **Calibre:** el tamaño se determinó con un calibre pie de rey digital en el eje ecuatorial y meridional del fruto.
- **pH:** los valores de pH se obtuvieron con un pHmetro digital CRISON PH25, previamente calibrado, introduciendo el electrodo a una profundidad de 5 mm en la placenta de cada uno de los frutos analizados.
- **Brix:** el contenido en sólidos solubles se evaluó haciendo uso de un refractómetro digital ATAGO Pallete PR – 101α (Brix 0-45%). Para ello se obtuvo una muestra del jugo de la pulpa de cada fruto y se colocaron entre 2-3 gotas sobre el lector óptico, previamente calibrado.
- **Color:** los frutos fueron evaluados haciendo uso de un colorímetro CHROMA METER CR-400. Para cada fruto se tomaron 3 medidas de color en tres posiciones distintas, a saber: corona, ecuador y zona inferior (Figura 4).
- **Número de lóculos:** para poder evaluar este carácter, se cortó transversalmente cada fruto y se cuantificó el número de lóculos de forma visual.

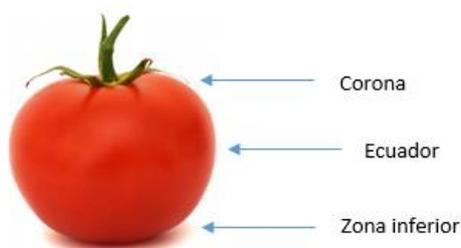


Figura 4 Esquema de las zonas de tomas de muestras de colorimetría

3.3. Estudios celulares

Se analizaron botones florales (BF) en diferentes estadios según la descripción de Mazzucaro, *et al.* A saber, botones florales con una longitud de entre 6 a 8,9 mm (BF1) y de 9 a 12 mm. Asimismo, se evaluaron flores en pre-antesis (PA) (Figura 5).

En cada una de los distintos estadios evaluados se determinó el número de células por mm² que contiene el ovario. Para ello, las muestras fueron fijadas en una solución FAE (formaldehído, ácido acético, etanol del 95% y agua destilada (10:5:50:35 v/v/v/v)) y fueron sometidas a vacío durante 10 minutos con una bomba de vacío modelo Büchi Vac V-500. Posteriormente, se renovó el fijador FAE y las muestras permanecieron a 4°C durante dos días. Transcurrido este periodo, los tejidos fueron deshidratados, pasándolos por sucesivos lavados de etanol en concentraciones ascendentes (70%, 85%, 96%, 100%). Para su inclusión en parafina (Paraplast Plus, Sigma) las muestras se introdujeron en soluciones crecientes de HistoClear (National Diagnostic) en etanol (25%, 50%, 100% de HistoClear) y posteriormente se incluyeron gradualmente en series crecientes de parafina en HistoClear a 58°C hasta llegar a parafina absoluta. Tras dos días en parafina absoluta en los cuales se iban haciendo cambios a parafina fresca, las muestras se colocaron en moldes adecuados para seccionarlas y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

Las muestras incluidas en parafina se seccionaron en un micrótopo rotatorio Leica RM-2035. Se cortaron secciones de 8µm del eje longitudinal del ovulo y el estilo. Una vez obtenidos los cortes, se fijaron al porta incubándolos en una placa a 45°C o/n. Una vez sobre los portas, las secciones de tejidos se tiñeron mediante un proceso de hidratación y posterior incubación con el colorante azul de toluidina. Las observaciones y fotografías se realizaron con una lupa estereoscópica Nikon SMZ-2T, provista de una cámara digital Nikon DXM1200C. Para el conteo celular se usó un microscopio Nikon Optiphot-2.

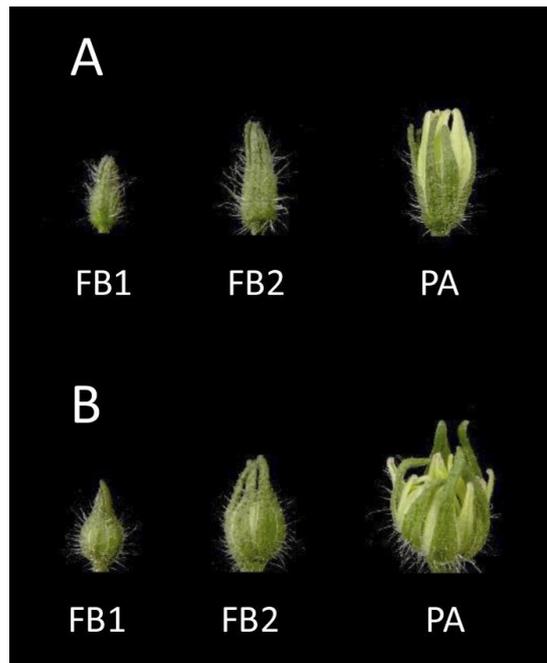


Figura 5 Estadios florales evaluados para determinar el número de células por mm² que contiene el ovario de las plantas de fenotipo silvestre, WT (A), y mutante, *eno* (B).

3.4. Análisis estadístico

Los resultados de este estudio se presentan como valores de la media \pm la desviación típica. Se realizó el análisis estadístico LSD (Least Significant Difference) con el programa Statgraphics centurion XVI, para comprobar si existen diferencias significativas entre el valor medio de las plantas de fenotipo silvestre y la media de los individuos mutantes. Una probabilidad de $P < 0.01$ fue considerada como estadísticamente significativa.

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización fenotípica

La evaluación del número de hojas hasta la primera inflorescencia reveló que existen diferencias significativas en el tiempo de floración entre el mutante *eno* y el WT, mostrando *eno* un mayor retraso en la floración (Figura 6). Por tanto, los resultados muestran que *ENO* podría estar implicado en la ruta de diferenciación celular que origina el meristemo de inflorescencia. Este retraso en el tiempo de

floración puede ser debido a que el mutante *eno* requiere más tiempo para almacenar nutrientes y energía, necesarios para desarrollar flores con un mayor número de órganos.

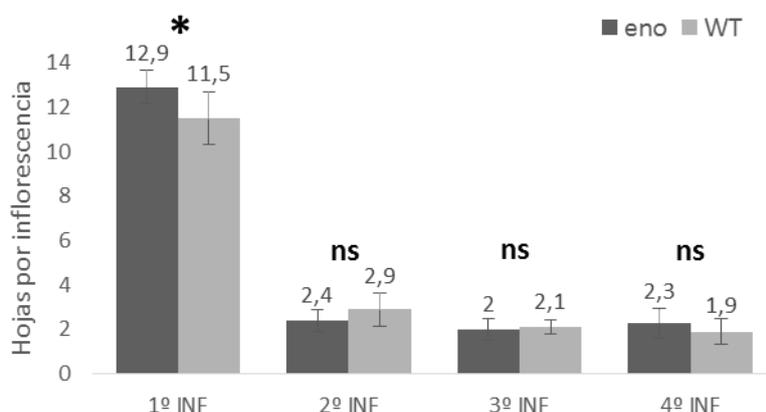


Figura 6 Comparación de medias del número de hojas entre inflorescencias. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

Los tallos secundarios pueden surgir de la zona adaxial de cada hoja y surgen a partir de un meristemo axilar que en el caso de tomate se puede detectar muy temprano en el desarrollo de la planta. Existen dos modelos sobre la procedencia de las células que conforman el meristemo axilar. El primero teoriza que estas células provienen directamente de células del meristemo apical, mientras que el segundo sugiere que estas células sufren un proceso de dediferenciación que lleva a la formación de células meristemáticas (Aguilar Martínez, 2007). Dado que *ENO* está implicado en el desarrollo del meristemo floral, se computó el número de tallos secundarios por planta, con el objeto de conocer la posible implicación de este gen en el desarrollo del meristemo axilar. Los resultados mostraron que el número de tallos secundarios no es significativamente diferente entre las plantas mutantes y las plantas WT (Figura 7), por lo que sugerimos que *ENO* no tiene implicación en el desarrollo del meristemo axilar ni en la formación de estas estructuras secundarias.

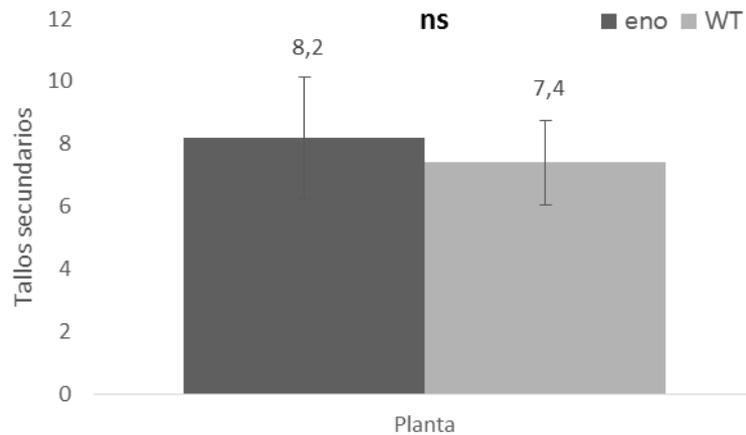


Figura 7 Comparación de medias del número de tallos secundarios por planta. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

Asimismo, se ha determinado el número de flores por inflorescencia para comprobar si *ENO* es responsable de un aumento del número de flores (Figura 8). Los resultados muestran que el mutante *eno* presenta un mayor número de flores en todos los ramos menos en el segundo. Sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo. El mutante presenta un número de flores significativamente superior en los ramos impares (1º y 3º), disminuyendo el número en los ramos pares (2º y 4º). Para el WT no se presencian diferencias estadísticamente significativas entre las distintas inflorescencias. Esta disminución en el número de flores puede deberse al esfuerzo energético al que la planta se somete para desarrollar flores que poseen un mayor número de órganos (Fernández-Lozano, et al., 2015), en la inflorescencia anterior y que por ello disminuyen el número de flores en la siguiente inflorescencia (Tabla 1).

Tabla 1 Medias y desviación típica del número de flores por inflorescencia. Los valores precedidos por la misma letra (a o b) no presentan diferencias estadísticamente significativas. ($P < 0.01$).

Nº de flores	1º inflorescencia	2º inflorescencia	3º inflorescencia	4º inflorescencia	Total
WT	11±3,83 ^a	7,8±2,57 ^a	6,7±2,54 ^a	6±1,15 ^a	7,68±3,30
<i>eno</i>	13,6±1,84 ^a	7±3,23 ^b	9,6±3,47 ^a	7±3,74 ^b	9,3±4,08

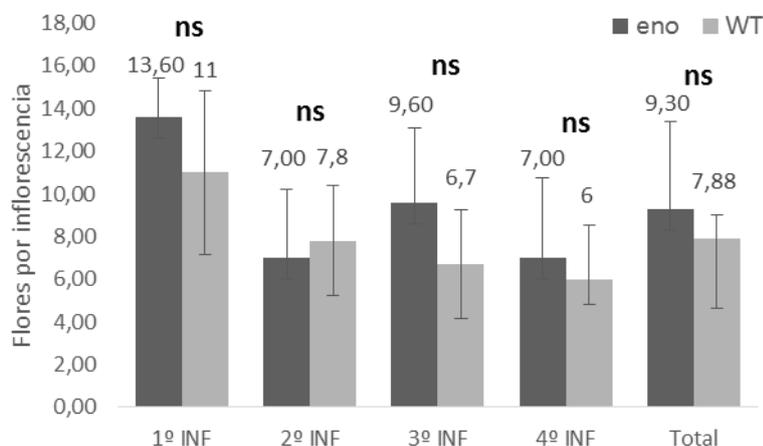


Figura 8 Comparación de medias del número de flores por inflorescencia. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

Fernández-Lozano *et al.*, determinó que el mutante *eno* presenta un mayor número de órganos florales en los tres verticilos internos de la flor. Las flores WT están compuestas por 6-7 sépalos en el verticilo más externo, que se alterna con igual número de pétalos en el segundo verticilo. Se presentan alrededor de 6-7 estambres rodeando al pistilo y 4-5 carpelos fusionados en el verticilo más interno. En el caso de *eno*, las flores presentan 6-7 sépalos, 10-13 pétalos, 12-18 estambres y 12-18 carpelos, siendo este número significativamente mayor que en las flores WT. Esto indica que *ENO* está implicado en el control del número de órganos durante el desarrollo floral.

Uno de los rasgos más importantes agrónomicamente es el peso de los frutos. El aumento de la producción siempre ha sido un objetivo por parte de la biotecnología, ya que supondría un aumento en el rendimiento económico para el agricultor. Como discutimos en la introducción, el tamaño del fruto en tomate está principalmente determinado por el número de carpelos que, de manera aproximada, será el número

de lóculos que presente el fruto. En este trabajo, se ha determinado el número de lóculos en el fruto, puesto que el aumento de carpelos está descrito en la bibliografía.

El número de lóculos en los frutos mutantes es significativamente superior que en el caso de los frutos WT (Figura 9), lo que se corresponde con el aumento de carpelos descrito en la bibliografía. Acompañado a este aumento en el número de lóculos, está el aumento en el peso del fruto. Como cabría esperar, e igual que lo descrito según Fernández-Lozano. *et al*, existe un aumento significativo del peso de los frutos en todas las inflorescencias medidas (Figura 10). El aumento del peso en los frutos se debe al aumento en el número de lóculos que presentan. Asimismo, este incremento de peso en los frutos *eno* se traduce en un incremento en la producción total, existiendo diferencias significativas ($P<0.01$) entre las plantas mutantes (28,9kg) y WT (16,11kg).

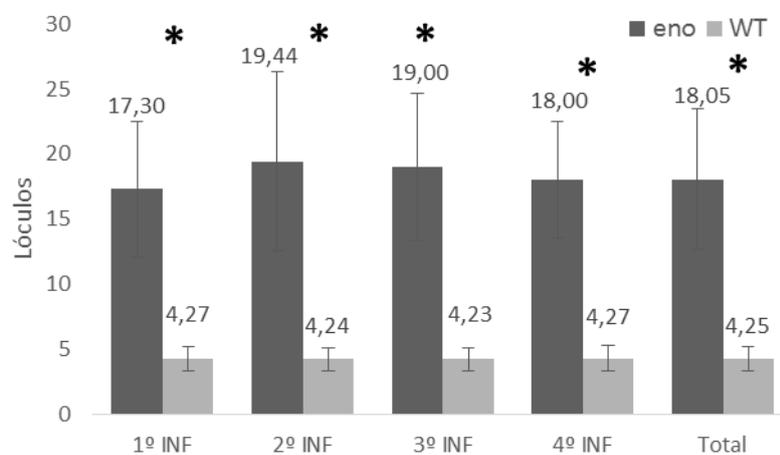


Figura 9 Comparación de medias del número de lóculos por fruto. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P<0.01$.

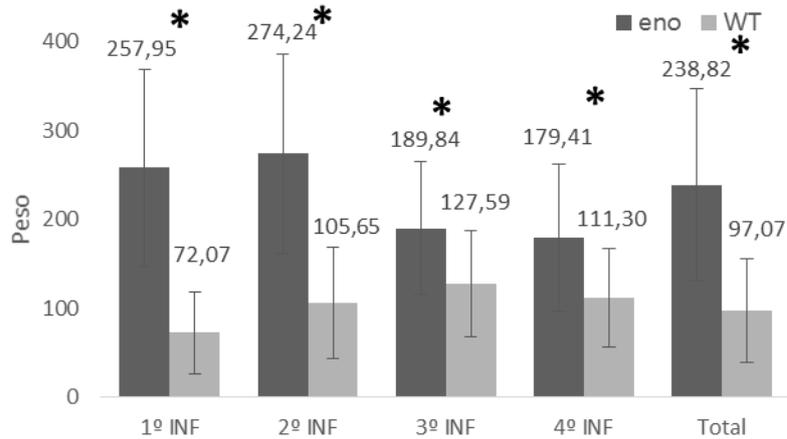


Figura 10 Comparación de medias del peso del fruto por inflorescencia. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

Una de las consecuencias del aumento del número de lóculos en el fruto es el aumento de tamaño de este. Como podemos observar, el aumento de los lóculos en los frutos *eno* se traduce en un mayor diámetro ecuatorial (Figura 11). Sin embargo, no existen diferencias significativas en el diámetro meridional de los frutos (Figura 12). Los frutos mutantes son más anchos que los mutantes para dar cabida al mayor número de lóculos que presenta, perdiendo la característica forma ovalada del fruto WT pasando a presentar una forma más aplanada y acostillado

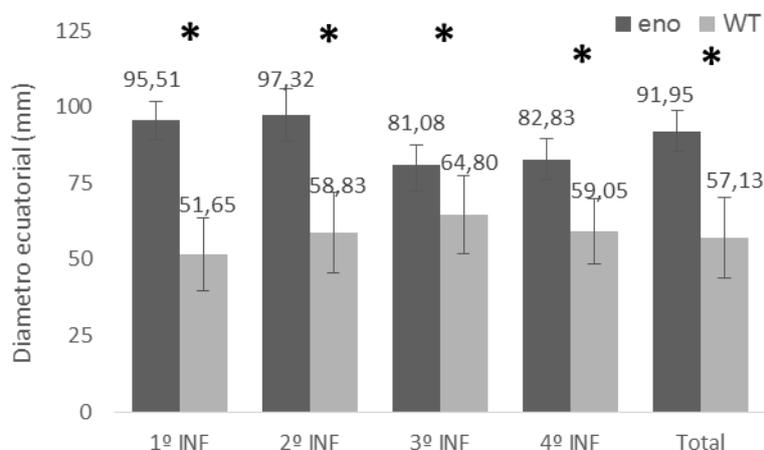


Figura 11 Comparación de medias del diámetro ecuatorial del fruto por inflorescencia. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

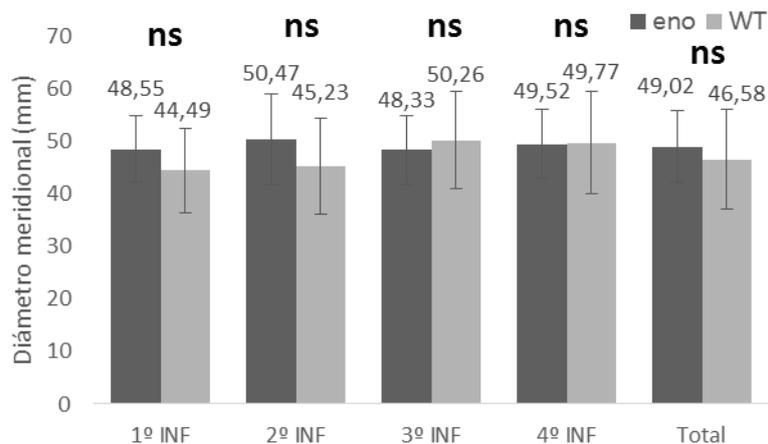


Figura 12 Comparación de medias del diámetro meridional del fruto por inflorescencia. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$

Dos de los parámetros medidos en esta caracterización son el pH y los grados brix. Estos caracteres agronómicos dan una medida del sabor del fruto, y son uno de los más estudiados a nivel biotecnológicos y de los de más interés a nivel de mercado. Los frutos *eno* presentan valores significativamente menores de pH en todas las inflorescencias menos en la cuarta. Esto se puede deber a un supuesto efecto pleiotrópico del gen *ENO* que afecta a la síntesis o acumulación de ácidos orgánicos en el fruto. Los valores de °Brix no presentan diferencias significativas entre plantas mutantes y WT, por lo que *ENO* no tiene efecto en la síntesis o almacenamiento de azúcares en el fruto.

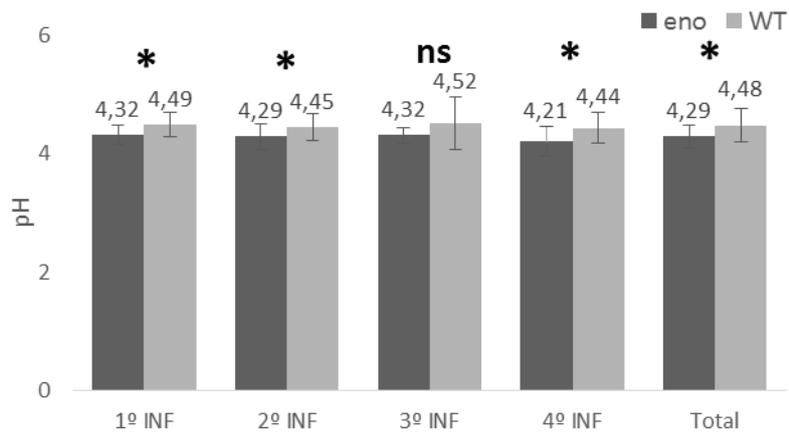


Figura 13 Comparación de medias del pH del fruto por inflorescencia. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

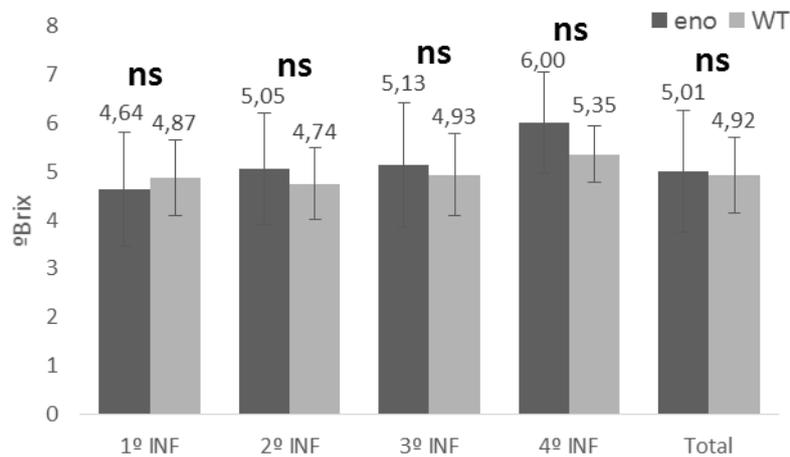


Figura 14 Comparación de medias de °Brix del fruto por inflorescencia. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

Por último se determinaron los diferentes valores del color para los frutos WT y *eno* (Figura 15, 16, 17 y 18). Dentro de los parámetros medidos en la determinación del color, no presentaron diferencias significativas la luminosidad del fruto (L) y el grado entre azul y amarillo que presenta el fruto (b). En el valor que determina el grado entre el verde y el magenta (a) es mayor en los frutos *eno*. Esto puede indicar que estos frutos son más oscuros, acercándose más al magenta, que los frutos WT, que tienen un valor más bajo. La diferencia en H indica que el tono del color de estos frutos

es mayor en los frutos WT que en los mutantes (Figura 19). La diferencia en la saturación es mayor en los frutos mutantes que en los frutos WT.

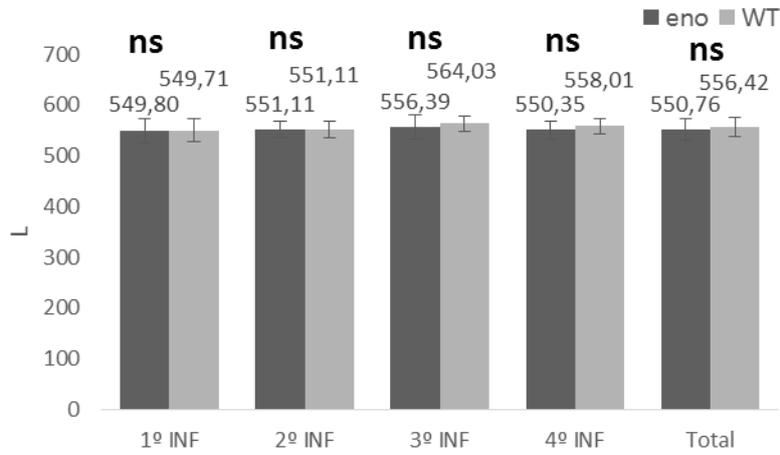


Figura 15 Comparación de medias del valor de luminosidad del fruto por inflorescencia. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

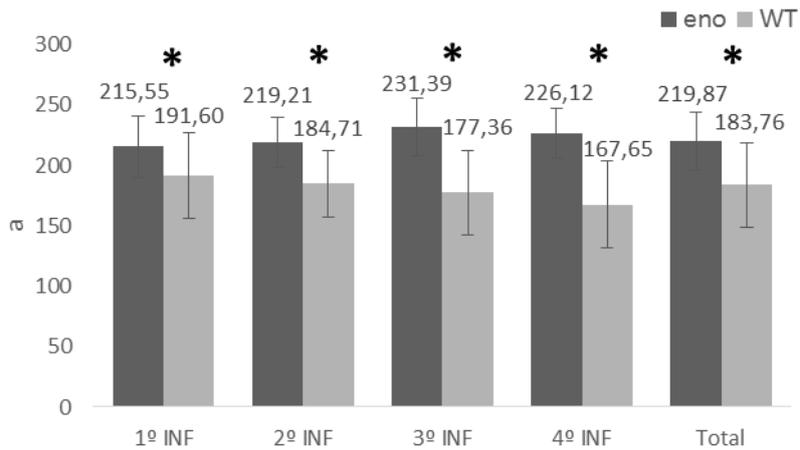


Figura 16 Comparación de medias del valor a (verde/magenta) del fruto por inflorescencia. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

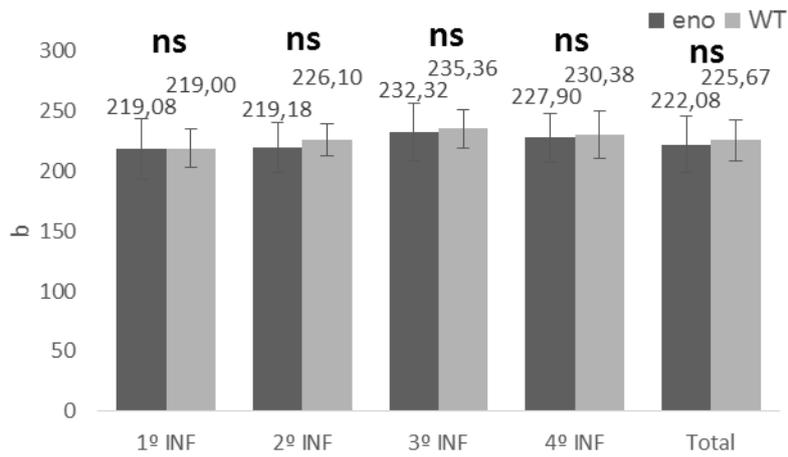


Figura 17 Comparación de medias del valor b (azul/amarillo) del fruto por inflorescencia. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

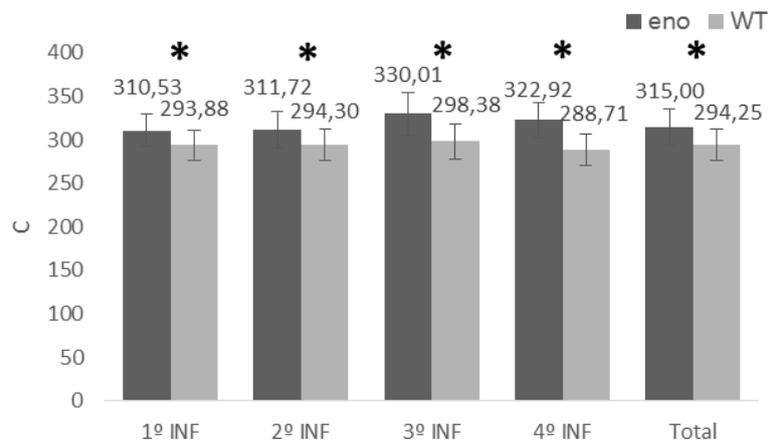


Figura 18 Comparación de medias del valor b de saturación del fruto por inflorescencia. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

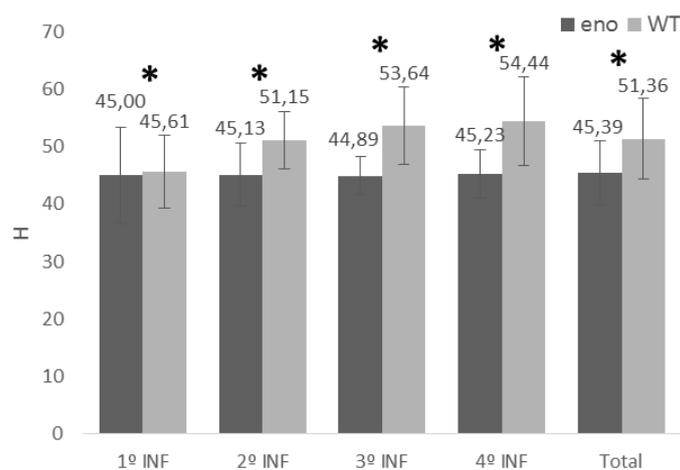


Figura 19 Comparación de medias del valor del tono del fruto por inflorescencia. ns, sin diferencia estadísticamente significativas. * diferencias estadísticamente significativas con $P < 0.01$.

4.2. Estudios celulares

Con el objeto de determinar si el aumento en el tamaño de las flores *eno* se debe a un incremento en el tamaño o a un mayor número de células, se realizó El conteo del número de células se realizó un estudio de microscopia en diferentes estadios del desarrollo floral. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas en el número de células por mm² entre flores mutantes y WT en los tres estadios florales evaluados, a saber botón floral 1 (BF1), botón floral 2 (BF2) y flores en pre antesis (PA) (Tabla 2). Por tanto, el incremento en el tamaño de la flor, y por ende el tamaño del fruto, se debe a un incremento del número de células, lo cual sugiere que *ENO* ejerce un papel en el ciclo celular, regulando el número de divisiones celulares durante el desarrollo floral. No obstante, son necesarios más estudios para esclarecer cuál es el papel que ejerce *ENO* en el ciclo celular.

*Tabla 2 Medias y desviación típica del número de células por mm² de los diferentes estadios florales * indica diferencias estadísticamente significativas (P<0.01).*

Células por mm ²	BF1	BF2	PA
WT	740,00±30,70	660,00±59,63	555,83±38,48
<i>eno</i>	719,17±53,68	651,67±43,66	564,17±38,48

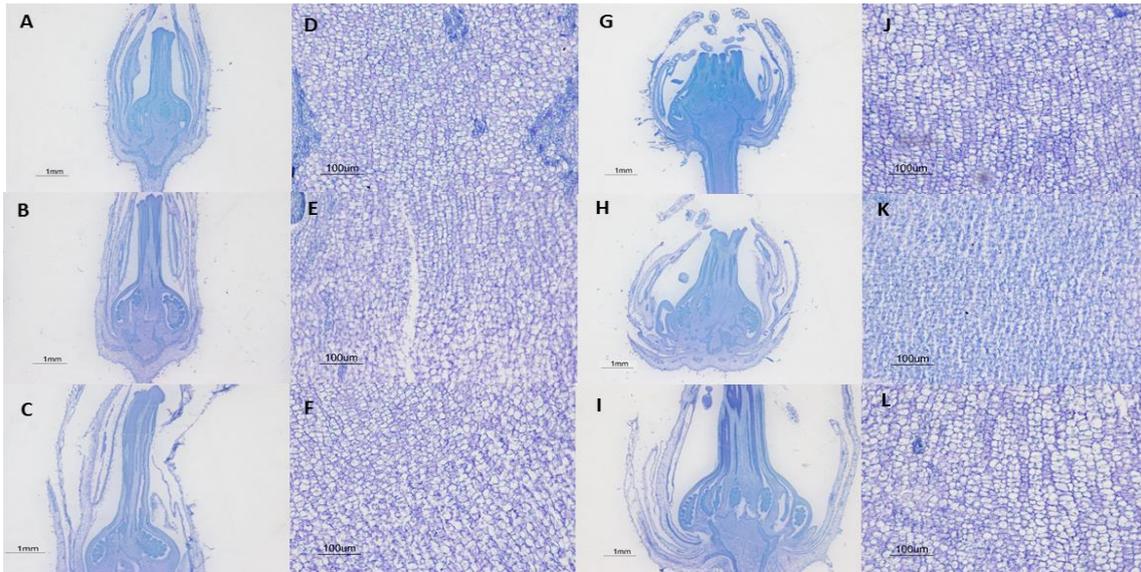


Figura 20 Representación de los estadios florales de plantas WT (A-C) y *eno* (G-I) en cortes observados a la lupa. Representación de los estadios florales de plantas WT (D-F) y *eno* (J-L) observados al microscopio.

5. Conclusiones

- La mutación *eno* produce un incremento en el número de lóculos de los frutos mutantes, lo cual se traduce en un incremento en el peso y en el tamaño meridional del fruto.
- El incremento en el peso de los frutos producidos por las plantas *eno* aumenta a su vez la producción en las plantas mutantes, siendo esta hasta dos veces más que en las plantas de fenotipo silvestre.
- No existen diferencias significativas en el número de células por mm² entre las flores mutantes y silvestres, lo cual sugiere que *ENO* está implicado en el control del ciclo celular, regulando el número de divisiones celulares durante el desarrollo floral.

6. Bibliografía

- Aguilar Martínez, J. A., 2007. *Análisis genético del desarrollo de los meristemos axiliares. Tesis Doctoral*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Allen, K. D. & Sussex, I. M., 1996. Falsiflora and anantha control early stages of floral meristem development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta*, Volumen 200, pp. 254-264.
- Atheron, J. & Harris, G., 1986. Flowering. En: *The tomato crop*. Cambridge: University Press, pp. 167-200.
- Barone, A. y otros, 2008. Structural and functional genomics of tomato. *International Journal of Plant Genomics*.
- Blázquez, M. A., Ferrándiz, C., Madueño, F. & Parcy, F., 2006. How floral meristems are built. *Plant Molecular Biology*, Volumen 60, pp. 855-870.
- Bouchez, D. & Höfte, H., 1998. Functional genomics in plants. *Plant Physiology*, Issue 118, pp. 725-732.
- Brand, U., Grunewald, M., Hobe, M. & Simon, R., 2002. Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, pp. 565-575.
- Causier, B., Schwarz-Sommer, Z. & Davies, B., 2010. Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, Volumen 21, pp. 73-79.
- Chakrabarti, M. y otros, 2013. A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), pp. 17125-17130.
- Clark, S., 2001. Cell signalling at the shoot meristem. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, Volumen 2, pp. 276-284.
- Coen, E. S. & Meyerowitz, E. M., 1991. The war of the whorls: genetics interactions controlling flower development. *Nature*, Volumen 353, pp. 31-37.
- Cong, B., Barrero, L. S. & Tanksley, S. D., 2008. Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature genetics*, Volumen 40, pp. 800-804.
- Diez, M. & Nuez, F., 2008. Tomato. En: *Handbook of plant breeding*. s.l.:Springer, pp. 249-327.
- Esquinas-Alcázar, J. & Nuez, F., 1995. Situación taxónomica, domesticación y difusión del tomate. En: *El cultivo del tomate*. Madrid: Mundi-Prensa, pp. 13-42.
- Fernández-Lozano, A. y otros, 2015. Mutation at tomato EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO) locus impairs floral meristem development, thus promoting an increased number of floral organs and fruit size. *Plant Science*, Volumen 232, pp. 41-48.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2015. *FAOSTAT*. [En línea] Available at: <http://faostat3.fao.org/home>
- Fooland, M., 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, pp. 1-52.

- Giovannoni, J., 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, Volumen 16, pp. 170-180.
- Jack, T., 2004. Molecular and genetic mechanism of floral control. *Plant Cell*, Volumen 16, pp. 1-17.
- Junta de Andalucía , 2015. *Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural*. [En línea].
- Knapp, S., 2002. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany*, 57(377), pp. 2001-2022.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jürgens, G. & Laux, T., 2001. Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell*, Volumen 105, pp. 805-814.
- Lenhard, M. & Laux, T., 2003. Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. *Development*, Volumen 130, pp. 3163-3173.
- Liu, J., Cong, B. & Tanksley, S. D., 2003. Generation and analysis of an artificial gene dosage series in tomato to study the mechanisms by which the cloned quantitative trait locus fw2.2 controls fruit size. *Plant Physiology*, Volumen 132, pp. 292-299.
- Lohmann, J. y otros, 2001. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell*, Volumen 105, pp. 793-803.
- Mayer, K. y otros, 1998. Role of WUSCHEL in regulating stem cells in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell*, Volumen 95, pp. 805-815.
- Mazzucaro, A., Taddel, A. R. & Soressi, G. P., 1998. The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development*, Volumen 107-114, p. 125.
- Molinero-Rosales, N. y otros, 1999. FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant Journal*, 20(6), pp. 685-693.
- Muños, S. y otros, 2011. Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. *Plant Physiology*, Volumen 156, pp. 2244-2254.
- Ruan, Y.-L. y otros, 2012. Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends in Plant Science*, 17(11), pp. 656-665.
- Salinas, M., 2006. *Resistencia a araña roja en tomate: análisis genético y mapeo de QTLs*. Tesis doctoral. Almería: Universidad de Almería.
- Schoof, H. y otros, 2000. The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, Volumen 100, pp. 635-644.
- Sultz, E. & Haughn, G., 1991. LEAFY, a homeotic gene that regulates inflorescence development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 3(8), pp. 771-781.
- Seymour, G. & Granell, A., 2014. Fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), pp. 4489-4490.

Sicard, A. y otros, 2008. Meristem activity during flower and ovule development in tomato is controlled by the mini zinc finger gene INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY. *The Plant Journal*, Volumen 55, pp. 415-427.

Sicard, A. y otros, 2008. Meristem activity during flower and ovule development in tomato is controlled by the mini zinc finger gene INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY. *Plant Journal*, Volumen 55, pp. 415-427.

Steeves, S. & Sussex, I., 1989. *Patterns in plant development*. Cambridge: Cambridge University Press.

Tanksley, S. D., 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of the fruit size and shape variation in tomato.. *Plant Cell*, Volumen 18, pp. 181-189.

The Tomato Genome Consortium, 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, Volumen 485, pp. 635-641.

van der Knaap, E. y otros, 2014. What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Frontiers in Plant Science*, Volumen 5, p. 227.

Weigel, D., 1995. The genetics of flower development: from floral induction to ovule morphogenesis. *Annual Review of Genetics*, Volumen 29, pp. 19-39.

Xu, C. y otros, 2015. A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics*, p. ePub ahead of print.

Xu, C. y otros, 2015. A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genetics*, Issue 47, pp. 784-792.